

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

FRANCIELLI LICKS

**A N-ACETILCISTEÍNA ATENUA OS DANOS GÁSTRICOS E INTESTINAIS  
NA SÍNDROME DA HIPERTENSÃO PORTAL**

Porto Alegre

2017

FRANCIELLI LICKS

**A N-ACETILCISTEÍNA ATENUA OS DANOS GÁSTRICOS E INTESTINAIS  
NA SÍNDROME DA HIPERTENSÃO PORTAL**

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

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

Porto Alegre

2017

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

Albert Einstein

Dedico este trabalho ao meu pai.  
Meu amigo, meu norte, meu herói.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela oportunidade da minha formação acadêmica, bem como a todos os professores do curso pelos inúmeros ensinamentos.

A minha orientadora, Dra. Norma Marroni, por toda a confiança e apoio durante essa caminhada. Obrigada por me conduzir nesta trajetória, por todo o carinho e aprendizagem, por ser sempre muito mais que minha orientadora. Agradeço também ao Dr Cláudio Marroni, por todo seu envolvimento na minha formação, pelo auxílio, pelas sugestões e incansáveis leituras.

Ao meu co-orientador, Dr. Henrique Fillmann, por toda sua atenção e orientação. Muito obrigada por me acolher e me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho, mesmo em momentos de muitas dúvidas. Obrigada pelo incentivo, apoio e segurança.

Aos colegas do laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental, muito obrigada pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço a Silvia, Julie, Sabrina, Camila e Mariana. Agradeço especialmente a Josiele e Elisângela, por terem me auxiliado de todas as formas possíveis. Esse trabalho também é de vocês. A minha grande amiga e colega, Renata, por ter sido uma peça tão importante dentro da construção deste sonho. Foi um prazer trilhar este caminho ao seu lado.

Aos meus amigos do coração, Mateus, Anelise, Laura, Nubia e Diogo, por estarem sempre me apoiando em todos os momentos, bons e ruins.

A minha família, pelo incansável apoio e incentivo durante toda a minha trajetória acadêmica. Obrigada aos meus irmãos, Irineu e Dhiovanna me guiar ao longo, por sempre estarem perto, mesmo quando eu estava longe. Obrigada a minha mãe, por ter me ensinado o valor do estudo, e por sempre ter fé no meu sucesso, incentivando-me a jamais desistir. Obrigada ao meu pai, por me proporcionar a realização do meu sonho. Obrigada pelo amor, incentivo, palavras de apoio. Sem você nada disso seria possível.

Por fim agradeço a Deus, por me iluminar e me guiar ao longo de toda minha vida.

## RESUMO ARTIGO I

A Hipertensão Portal (HP) é uma síndrome clínica associada ao desenvolvimento de uma circulação hiperdinâmica e varizes gastroesofágicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antioxidante da N-Acetilcisteína (NAC) em ratos com hipertensão portal. A HP foi induzida através modelo experimental de ligadura parcial da veia porta (LPVP). O dano oxidativo no estômago foi avaliado através do nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade de enzimas antioxidantes. Também foram avaliados os níveis de nitritos e nitratos e promovida a análise histológica através da coloração de hematoxilina-eosina. A pressão portal e o diâmetro dos vasos foram mensurados. O dano hepático foi avaliado através das enzimas aspartato amino-transferase (AST), alanina amino-transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Os animais foram 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. Os animais do grupo LPVP apresentaram um aumento significativo nos valores de pressão portal, diâmetro vascular, níveis de TBARS e nitritos e nitratos quando comparados ao grupo SO. Esses valores foram acompanhados por uma redução das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx). A análise histológica demonstrou vasos dilatados na mucosa gástrica dos animais do grupo LPVP. A NAC foi capaz de reduzir valores de pressão portal, diâmetro vascular, níveis de TBARS e nitritos e nitratos quando comparados ao grupo LPVP. Ainda, o grupo LPVP + NAC demonstrou um aumento na atividade da SOD e GPx. A N-acetilcisteína atenuou o dano no estômago dos animais estudados. Concluímos que o estresse oxidativo é associado à hipertensão portal e que o antioxidante NAC é capaz de minimizar os danos em animais LPVP.

**Palavres-chave:** Ligadura parcial da veia porta, Estresse oxidativo, Hipertensão Portal

## RESUMO ARTIGO II

A Hipertensão Portal é associada ao desenvolvimento de uma circulação colateral devido a um aumento progressivo da pressão portal. Este estado hiperdinâmico provoca dilatação em vários segmentos do aparelho digestivo, incluindo o estômago. Nosso objetivo foi avaliar o efeito antioxidante da N-acetilcisteína no estômago de ratos com hipertensão portal. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=6): Sham-operated (SO), SO + NAC, ligadura parcial da veia porta (LPVP) e LPVP + NAC. A N-acetilcisteína (10 mg/kg ip) foi administrada diariamente durante 7, iniciados no 8º dia após a cirurgia. Foi realizada a mensuração da pressão portal e imunohistoquímica das proteínas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e nitrotirosina (NTT) no estômago. Avaliamos também a eNOS e VEGF por *Western blot* e o dano de DNA em amostra de sangue por ensaio de cometa. O grupo com hipertensão portal apresentou um aumento da pressão portal e expressão de eNOS, VEGF e NTT quando comparado ao grupo SO. A NAC foi capaz de diminuir os valores da pressão portal e a expressão de todas as proteínas avaliadas. Ainda, a NAC reduziu o dano ao DNA nos animais do grupo LPVP + NAC. Em conclusão, a NAC foi capaz de minimizar a vasodilatação gástrica, avaliada por eNOS; a angiogênese, avaliada pelo VEGF; e o estresse oxidativo, avaliado por NTT. Este tratamento antioxidante também protegeu os animais de danos ao DNA. Com esses resultados, concluímos que a NAC é capaz de proteger o estômago das alterações induzidas pelo procedimento de LPVP.

**Palavres-chave:** N-acetilcisteína, Gastropatia da Hipertensão Portal, Estresse oxidativo, Antioxidante

### RESUMO ARTIGO III

A hipertensão portal (HP) é uma síndrome frequentemente associada à cirrose, caracterizada por um progressivo aumento de pressão no sistema portal e consequente dilatação vascular compensatória. As alterações vasculares gástricas caracterizam o quadro de gastropatia, sendo essas associadas ao estresse oxidativo e nitrosativo. Ainda, o processo inflamatório é considerado um fator agravante na severidade do quadro acima descrito, sendo frequentemente associado à angiogênese presente na HP. Nosso objetivo foi verificar a ação anti-inflamatória da N-acetilcisteína (NAC) no estômago de ratos com hipertensão portal. 18 ratos machos Wistar foram utilizados neste protocolo experimental, sendo esses divididos em três grupos (n=6): Sham-operated (SO), ligadura parcial da veia porta (LPVP) e LPVP + NAC. O tratamento com a N-acetilcisteína (NAC) na dose de (10 mg/kg ip) foi iniciado no oitavo dia após a cirurgia e ocorreu durante 7 dias posteriores. Nós avaliamos a expressão do fator nuclear-  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) através da técnica de imunohistoquímica, bem como a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO-1), proteína de choque térmico 90 (HSP-90) e superóxido dismutase (SOD) através da técnica de *Western blot*, nos estômagos dos ratos utilizados neste estudo. O grupo LPVP demonstrou um aumento da expressão de todos os parâmetros avaliados, sendo a NAC capaz de reduzi-los. Observando esses resultados, podemos concluir a eficácia deste tratamento como anti-inflamatório e antioxidante em animais com gastropatia da hipertensão portal decorrente do modelo de ligadura parcial da veia porta.

**Palavras-chave:** N-acetilcisteína, Gastropatia da Hipertensão portal, Estresse oxidativo, Inflamação



## RESUMO ARTIGO IV

A hipertensão portal (HP) é caracterizada por vasodilatação no sistema portal e o intestino é um dos órgãos gravemente afetados. N-acetilcisteína (NAC) é uma molécula com propriedades importantes, amplamente utilizada na prática clínica. Nosso objetivo foi avaliar a ação da NAC no intestino de animais submetidos ao modelo animal de Ligadura parcial da veia porta (LPVP). 18 ratos Wistar machos foram divididos em três grupos experimentais (n = 6): Sham-operated (SO), LPVP e LPVP + NAC. No 8º dia após a cirurgia, a N-acetilcisteína (10 mg/kg, ip) foi administrada diariamente durante 7 dias. No 15º dia, o intestino dos animais foi coletado para análise de estresse oxidativo, imuno-histoquímica e *Western blot*. Nós avaliamos a expressão do fator nuclear-  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) por imuno-histoquímica e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) por *Western blot*. A lipoperoxidação foi avaliada pela técnica de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) foram verificadas. Observamos um aumento da expressão de NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  no grupo LPVP e na expressão da iNOS avaliada por *Western blot*. A NAC reduziu a expressão de todas as proteínas avaliadas. Observou-se também um aumento no estresse oxidativo no intestino dos ratos do grupo LPVP quando comparados ao grupo SO, sendo a NAC eficaz na redução desses valores no grupo LPVP + NAC. Também observamos uma redução na atividade das enzimas SOD e GPx no grupo com hipertensão portal, e a NAC foi capaz de restaurar a atividade das enzimas avaliadas. Sugerimos a ação antiinflamatória e antioxidante da NAC no intestino dos animais submetidos ao modelo LPVP.

**Palavras-chave:** N-Acetilcisteína, Hipertensão Portal, Intestino, Estresse Oxidativo, Inflamação

## ABSTRACT I

Portal hypertension is a clinical syndrome associated with the development of a hyperdynamic circulation and gastroesophageal varices. Our aim was to evaluate the antioxidant effect of N-acetylcysteine on portal hypertensive rats. Portal hypertension was induced by partial portal vein ligation (PPVL). 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. The portal hypertensive group showed an increase in portal pressure, vessels diameter, levels of TBARS and nitrates and nitrites level 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. 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. N-acetylcysteine attenuated damage in gastric mucosa. Oxidative stress is associated with portal hypertension and antioxidant NAC is able to minimize damages of PPVL in rats.

**Key-words:** Partial portal vein ligation, Oxidative stress, Portal hypertension

## ABSTRACT II

Portal Hypertension is associated with the development of a collateral circulation due to a progressive increase on portal pressure. This hyperdynamic state leads to dilation in several segments of the digestive tract, including stomach. Our aim was evaluate the antioxidant effect of N-Acetylcysteine in the stomach of portal hypertensive rats. 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. We performed evaluation of portal pressure and immunohistochemistry of eNOS, VEGF and NTT proteins in stomach. We also evaluated eNOS and VEGF by Western blot analysis and assessed DNA damage in blood sample by comet assay. The portal hypertensive group showed an increase in portal pressure, eNOS, VEGF and NTT expression when compared to SO group. NAC was able to decrease portal pressure values, and the expression of all the evaluated proteins. Furthermore, NAC was able to modulate DNA damage in PPVL + NAC animals. In conclusion, NAC was able to minimize gastric vasodilation, evaluated by eNOS, angiogenesis evaluated by VEGF, and oxidative stress evaluated by NTT. This antioxidant treatment protected the animals from DNA damage. Due to this results, we believe NAC is able to protect stomach from the alterations developed by the PPVL procedure.

**Key Words:** N-Acetylcysteine, Portal hypertensive gastropathy, Oxidative stress, Antioxidant

### ABSTRACT III

Portal hypertension (PH) is a syndrome associated with cirrhosis and characterized by a progressive increase in portal pressure, with consequent compensatory vascular dilation. Gastric vascular changes associated with oxidative and nitrosative stress characterize the clinical presentation of portal hypertensive gastropathy. In addition, the inflammatory process is considered an aggravating factor for severity, by contributing to the gastric tissue injury. Our aim was to investigate the synergistic anti-inflammatory and antioxidant action of N-acetylcysteine (NAC) in the stomach of rats with portal hypertension. Eighteen male Wistar rats were used in this experimental protocol, divided into three groups (n=6): sham-operated (SO), partial portal vein ligation (PPVL), and PPVL + NAC. Treatment with NAC at a dose of 10 mg/kg (i.p.) was initiated on the 8<sup>th</sup> day after surgery and continued for 7 days. We evaluated expression of iNOS, NQO-1, HSP-90, and SOD by Western blot, as well as NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  staining by immunohistochemistry, in the rat stomach. The PPVL group exhibited increased expression of HSP-90, iNOS, SOD and NQO-1 when compared to controls. NAC reduced the expression of all studied proteins. Similarly, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  staining was increased in PPVL animals and reduced in PPVL + NAC group. These results suggest the effectiveness of NAC as a dual anti-inflammatory and antioxidant in animals with experimental portal hypertensive gastropathy induced by partial ligation of the portal vein.

**Key Words:** N-Acetylcysteine, Portal hypertensive gastropathy, Oxidative stress, Inflammation

## ABSTRACT IV

Portal hypertension (PH) is characterized by vasodilatation in the portal system and the bowel is one of the severely affected organs. N-acetylcysteine (NAC) is a molecule with important properties and widely used in clinical practice. Our aim was to evaluate NAC action in the bowel of animals submitted to the animal model of partial portal vein ligation (PPVL). 18 male Wistar rats were divided into three experimental groups (n = 6): sham - operated (SO), PPVL, and PPVL + NAC. On the 8th day after surgery, N-acetylcysteine (10 mg/kg, ip) was administered daily for 7 days. On the 15th day the animals' bowel was collected for oxidative stress analysis, immunohistochemistry and Western blot. We evaluated the expression of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  by immunohistochemistry and iNOS by Western blot. Lipid peroxidation was assessed by TBARS technique, and the activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) were checked. We observed an increased expression of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in PPVL group, and an increased iNOS expression assessed by Western blot. NAC reduced the expression of all proteins evaluated. We also observed an increase in oxidative stress in the bowel of mice PPVL group when compared to controls (SO), and NAC was effective in reducing these values in PPVL + NAC group. Also, a reduction in the activity of SOD and GPx enzymes was observed in the diseased group, and NAC was able to restore the activity of the enzymes assessed. We suggest the anti-inflammatory and antioxidant action of NAC in the bowel of animals submitted to PPVL model.

**Key Words:** N-Acetylcysteine, Portal hypertension, Intestine, Oxidative stress, Inflammation

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema digestório.....	2924
Figura 2: Anatomia do estômago. ....	3226
Figura 3: Anatomia do intestino grosso. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 27
Figura 4: Anatomia do sistema venoso portal. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 5: Locais de aumento da resistência vascular.....	35
Figura 6: <i>Caput medusae</i> . ....	44
Figura 7: Gastropatia moderada e grave.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 8: Colopatia.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 9: Modelo de ligadura parcial da veia porta (LPVP).	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 9
Figura 10: Isoformas da NOS.....	39
Figura 11: Formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 12: Ação da SOD e NQO1. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 13: Ação da glutathiona peroxidase (GPx).....	48
Figura 14: Ação e ativação do NF-κB.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 1
Figura 15: HSP90.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 6
Figura 16: Fórmula química da N-acetilcisteína (NAC). ....	58
Figura 17: Ações da N-acetilcisteína (NAC).....	59
Figura 18: Ligadura parcial da veia porta (LPVP).	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 7
Figura 19: Polígrafo de pressão Lettica (Rochester, MI, USA).....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CHP	Colopatia da Hipertensão Portal
ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato-aminotransferase
C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> S	Fórmula química da NAC
CAT	Catalase
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de carbono
cm	Centímetro
cNOS	Óxido nítrico sintase dependente de cálcio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de Oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
g	Grama
GHP	Gastropatia da hipertensão portal
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona Dissulfeto
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HP	Hipertensão portal
HSP	Proteínas de choque térmico
IG-g	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma
LPVP	Ligadura parcial de veia porta
LPVP+NAC	Ligadura parcial de veia porta tratado com N-acetilcisteína
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de dinitrogênio
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Solução fisiológica
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF- <i>κ</i> B	Fator nuclear- <i>κ</i> B
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NO <sub>3</sub>	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase

NQO1	NAD(P)H quinona oxidoreductase 1
NTT	Nitrotirosina
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion radical superóxido
OH <sup>•</sup>	radical hidroxil
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PVDF	Membrana de fluoreto de polivinilideno
rpm	Rotação por minuto
SDS-PAGE	Gel de sulfato de sódio-poliacrilamida
SO	Sham-operated - controle (simulação da cirurgia)
SO+NAC	Sham operated – controle tratado com N-acetilcisteína
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
TTBS	Solução salina Trisbuffered
U/L	Unidade por litro
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu$	Micra
$\mu$ L	Microlitro



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>24</b>
1.1 ANATOMIA E FISILOGIA DO SISTEMA DIGESTÓRIO.....	24
1.1.1 Anatomia e Fisiologia do Estômago.....	25
1.1.2 Anatomia e Fisiologia do Intestino Grosso.....	27
1.1.3 Anatomia e Fisiologia do Sistema Venoso Portal.....	28
1.2 HIPERTENSÃO PORTAL.....	31
1.2.1 Gastropatia da Hipertensão Portal.....	34
1.2.2 Colopatia da Hipertensão Portal.....	35
1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERTENSÃO PORTAL.....	37
1.3.1 Ligadura Parcial de Veia Porta.....	39
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO NA HIPERTENSÃO PORTAL.....	40
1.4.1 Óxido Nítrico.....	40
1.4.1.1 Óxido Nítrico na Gastropatia da Hipertensão Portal.....	42
1.4.1.2 Óxido nítrico na Colopatia da Hipertensão Portal.....	43
1.4.2 Radicais Livres e Sistema Antioxidante.....	43
1.4.2.1 Radicais Livres na Gastropatia da Hipertensão Portal.....	45
1.4.2.1.1 Peroxidação de Lipídeos na Gastropatia da Hipertensão Portal.....	45
1.4.2.2 Defesas Antioxidantes na Gastropatia.....	46
1.4.2.2.1 Superóxido dismutase e NAD(P)H Quinona Oxidada.....	46
1.4.2.2.2 Glutaciona Peroxidase.....	47
1.4.2.3 Radicais Livres na Colopatia da Hipertensão Portal.....	48
1.4.2.3.1 Peroxidação de Lipídeos na Colopatia.....	48
1.4.2.4 Defesas Antioxidantes na Colopatia.....	49
1.4.2.4.1 Superóxido dismutase.....	49
1.4.2.4.2 Glutaciona Peroxidase.....	50
1.5 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....	50
1.5.1 Fator Nuclear- <i>κ</i> B.....	50
1.5.1.1 Fator Nuclear- <i>κ</i> B na Gastropatia da Hipertensão Portal.....	52
1.5.1.2 Fator Nuclear- <i>κ</i> B na Colopatia da Hipertensão Portal.....	52
1.5.2 Fator de Necrose Tumoral.....	53
1.5.2.1 Fator de Necrose Tumoral na Gastropatia da Hipertensão Portal.....	54
1.5.2.2 Fator de Necrose Tumoral na Colopatia da Hipertensão Portal.....	54

1.6	PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.....	55
1.6.1	HSP90 na Gastropatia da Hipertensão Portal.....	56
1.7	DANOS AO DNA.....	57
1.7.1	Danoas ao DNA na Hipertensão Portal.....	58
1.8	N-ACETILCISTEÍNA.....	58
1.8.1	NAC na Gastropatia da Hipertensão Portal.....	60
1.8.2	NAC na Colopatia da Hipertensão Portal.....	61
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS DO ESTUDO.....</b>	<b>62</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	62
2.2.1	Experimento I.....	62
2.2.2	Experimento II.....	63
2.2.3	Experimento III.....	63
2.2.4	Experimento IV.....	64
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
3.1	EXPERIMENTO I.....	65
3.1.1	Delineamento do Estudo.....	65
3.1.2	Delineamento Experimental.....	65
3.1.2.1	<i>Animais.....</i>	<i>65</i>
3.1.2.2	<i>Considerações Bioéticas.....</i>	<i>65</i>
3.1.2.3	<i>Grupos Experimentais.....</i>	<i>66</i>
3.1.2.4	<i>Procedimentos Experimentais.....</i>	<i>66</i>
3.1.2.4.1	<i>Desenvolvimento do Modelo de Hipertensão Portal.....</i>	<i>67</i>
3.1.2.4.2	<i>Administração do Veículo e da N-acetilcisteína.....</i>	<i>68</i>
3.1.2.4.3	<i>Obtenção das Amostras de Tecido, Sangue e Morte dos Animais.....</i>	<i>68</i>
3.1.2.4.4	<i>Análises Laboratoriais.....</i>	<i>69</i>
3.1.2.4.4.1	<i>Aferição da Pressão Portal.....</i>	<i>69</i>
3.1.2.4.4.2	<i>Determinação das Enzimas Aspartato-aminotransferase, Alanina-aminotransferase e Fosfatase Alcalina.....</i>	<i>70</i>
3.1.2.4.4.3	<i>Preparo do Homogeneizado.....</i>	<i>70</i>
3.1.2.4.4.4	<i>Dosagem de Proteína.....</i>	<i>70</i>
3.1.2.4.4.5	<i>Determinação dos Níveis de Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico.....</i>	<i>71</i>
3.1.2.4.4.6	<i>Determinação dos Metabólitos do Óxido Nítrico (nitritos e nitratos).....</i>	<i>71</i>
3.1.2.4.4.7	<i>Determinação da Atividade da Enzima Sueróxido dismutase.....</i>	<i>72</i>

3.1.2.4.4.8	<i>Determinação da Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase.....</i>	72
3.1.2.4.5	<i>Análises Histológicas.....</i>	73
3.1.2.4.6	<i>Biossegurança e Descarte de Resíduos.....</i>	73
3.1.2.4.7	<i>Análise Estatística.....</i>	74
3.2	<b>EXPERIMENTO II.....</b>	74
3.2.1	<i>Delineamento do Estudo.....</i>	74
3.2.2	<i>Delineamento Experimental.....</i>	74
3.2.2.1	<i>Animais.....</i>	74
3.2.2.2	<i>Considerações Bioéticas.....</i>	74
3.2.2.3	<i>Grupos Experimentais.....</i>	75
3.2.2.4	<i>Procedimentos Experimentais.....</i>	76
3.2.2.4.1	<i>Desenvolvimento do Modelo de Hipertensão Portal.....</i>	76
3.2.2.4.2	<i>Administração do Veículo e da N-acetilcisteína.....</i>	76
3.2.2.4.3	<i>Obtenção das Amostras de Tecido, Sangue e Morte dos Animais.....</i>	77
3.2.2.4.4	<i>Análises Laboratoriais.....</i>	78
3.2.2.4.4.1	<i>Aferição da Pressão Portal.....</i>	78
3.2.2.4.4.2	<i>Avaliação da Expressão das Proteínas eNOS, VEGF e Nitrotirosina pela Técnica de Imunohistoquímica.....</i>	78
3.2.2.4.4.3	<i>Avaliação da Expressão das Proteínas eNOS e VEGF pela Técnica de Western blot.....</i>	79
3.2.2.4.4.4	<i>Avaliação dos Danos ao DNA Através do Ensaio Cometa.....</i>	79
3.2.2.4.5	<i>Biossegurança e Descarte de Resíduos.....</i>	80
3.2.2.4.6	<i>Análise Estatística.....</i>	81
3.3	<b>EXPERIMENTO III.....</b>	81
3.3.1	<i>Delineamento do Estudo.....</i>	81
3.3.2	<i>Delineamento Experimental.....</i>	81
3.3.2.1	<i>Animais.....</i>	81
3.3.2.2	<i>Considerações Bioéticas.....</i>	82
3.3.2.3	<i>Grupos Experimentais.....</i>	82
3.3.2.4	<i>Procedimentos Experimentais.....</i>	83
3.3.2.4.1	<i>Desenvolvimento do Modelo de Hipertensão Portal.....</i>	83
3.3.2.4.2	<i>Administração do Veículo e da N-acetilcisteína.....</i>	83
3.3.2.4.3	<i>Obtenção das Amostras de Tecido, Sangue e Morte dos Animais.....</i>	83
3.3.2.4.4	<i>Análises Laboratoriais.....</i>	85
3.3.2.4.4.1	<i>Avaliação da Expressão das Proteínas iNOS, HSP90, NQO1 e SOD pela Técnica de Western blot.....</i>	85

3.3.2.4.4.2	<i>Avaliação da Expressão das Proteínas NF-<math>\kappa</math>B e TNF-<math>\alpha</math> pela Técnica de Imunohistoquímica</i>	86
3.3.2.4.5	Biosseurança e Descarte de Resíduos	86
3.3.2.4.6	<i>Análise Estatística</i>	87
3.4	EXPERIMENTO IV	87
3.4.1	Delineamento do estudo	87
3.4.2	Delineamento Experimental	87
3.4.2.1	<i>Animais</i>	87
3.4.2.2	<i>Considerações Bioéticas</i>	87
3.4.2.3	<i>Grupos Experimentais</i>	88
3.4.2.4	<i>Procedimentos Experimentais</i>	89
3.4.2.4.1	<i>Desenvolvimento do Modelo de Hipertensão Portal</i>	89
3.4.2.4.2	<i>Administração do Veículo e da N-acetilcisteína</i>	89
3.4.2.4.3	<i>Obtenção das Amostras de Tecido, Sangue e Morte dos Animais</i>	90
3.4.2.4.4	<i>Análises Laboratoriais</i>	91
3.4.2.4.4.1	<i>Avaliação da Expressão das Proteínas NF-<math>\kappa</math>B e TNF-<math>\alpha</math> pela Técnica de Imunohistoquímica</i>	91
3.4.2.4.4.2	<i>Avaliação da Expressão da Proteína iNOS pela Técnica de Western blot</i>	91
3.4.2.4.4.3	<i>Preparo do Homogeneizado</i>	92
3.4.2.4.4.4	<i>Dosagem de Proteína</i>	92
3.4.2.4.4.5	<i>Determinação dos Níveis de Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico</i>	93
3.4.2.4.4.6	<i>Determinação da Atividade da Enzima Superóxido dismutase</i>	93
3.4.2.4.4.7	<i>Determinação da Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase</i>	94
3.4.2.4.5	<i>Biossegurança e Descarte de Resíduos</i>	94
3.4.2.4.6	<i>Análise Estatística</i>	94
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	96
4.1	EXPERIMENTO I	96
4.2	EXPERIMENTO II	107
4.3	EXPERIMENTO III	118
4.4	EXPERIMENTO IV	136
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b>	146
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	152
6.1	CONCLUSÕES ARTIGO I	152
6.2	CONCLUSÕES ARTIGO II	154

6.3 CONCLUSÕES ARTIGO III.....	155
6.4 CONCLUSÕES ARTIGO IV.....	156
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>158</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>159</b>

## INTRODUÇÃO

A hipertensão portal (HP) é uma síndrome clínica resultante do aumento progressivo de pressão no sistema portal, ocasionado por alterações na resistência vascular e/ou fluxo sanguíneo local. Este quadro é caracterizado pelo desenvolvimento de uma circulação colateral hiperdinâmica, considerado um mecanismo compensatório de decompressão que desvia o sangue proveniente do sistema portal diretamente para a circulação sistêmica (Bosch *et al.*, 2015).

Este mecanismo de decompressão no sistema portal é estabelecido através da dilatação vascular de diferentes locais do sistema digestório. Dentre os órgãos acometidos por este distúrbio hemodinâmico, a Gastropatia da Hipertensão Portal (GHP) caracteriza as alterações gástricas presentes nesta síndrome, e a Colopatia da Hipertensão Portal (CHP), por sua vez, as alterações intestinais (Urrunaga e Rockey, 2014).

Para estudar as alterações teciduais presentes na Hipertensão Portal, a literatura estabelece diferentes modelos experimentais com manifestações muito similares às aquelas encontradas na clínica. Dentre esses, o modelo de ligadura parcial da veia porta (LPVP) é o mais utilizado para estudar a patofisiologia da hipertensão portal pré-hepática. Desenvolvido por Sikuler *et al.* (1985), o modelo manifesta anormalidades equivalentes ao quadro clínico em um paciente com cerca de 7 dias após o procedimento cirúrgico de indução. Os animais apresentam *shunting* portossistêmico e circulação colateral hiperdinâmica uma semana após a Ligadura Parcial da Veia Porta, sendo esse modelo já previamente utilizado em diversos trabalhos do presente grupo de pesquisa.

O estresse oxidativo, nitrosativo e o processo inflamatório estão intimamente relacionados com as anormalidades gástricas e intestinais presentes na Hipertensão Portal. Dessa forma, o uso de um composto com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias parece promissor na proteção e/ou recuperação dos danos teciduais que caracterizam este quadro.

A N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante acessível e bem tolerado, amplamente utilizado na clínica médica. A NAC é considerada um antioxidante

direto, uma vez que atua como *scavenger* de radicais livres, e indireto devido à sua capacidade de elevar os níveis de glutathione (Dean *et al.*,2011). Ainda, suas propriedades anti-inflamatórias são relacionadas com a sua atividade modulatória em diferentes etapas do processo inflamatório e fagocítico, estimulando funções imunológicas e reduzindo níveis de citocinas pró-inflamatórias (De Andrade *et al.*, 2015).

Desta forma, o objetivo primordial deste estudo foi avaliar a ação antioxidante e anti-inflamatória da N-Acetilcisteína no estômago e intestino grosso de ratos submetidos ao modelo experimental de Ligadura Parcial da Veia Porta, um modelo de Hipertensão Portal.

Esta tese de doutorado está apresentada em quatro artigos científicos, os quais responderam aos objetivos específicos propostos em cada um dos trabalhos.

<p><b>Artigo Científico 1</b></p>	<p><i>Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats. Ann Hepatol 2014; 13(3):370-377.</i></p>
<p><b>Artigo Científico 2</b></p>	<p><i>N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats. World J Gastroenterol 2015; 21(43):12351-12360.</i></p>
<p><b>Artigo Científico 3</b></p>	<p><i>Synergistic antioxidant and anti-inflammatory action of N-acetylcysteine in portal hypertensive gastropathy in rats.</i> Submetido na revista <i>Plos One</i>.</p>
<p><b>Artigo Científico 4</b></p>	<p><i>Inflammatory bowel and oxidative stress changes in an experimental model of portal hypertension: action of N-acetylcysteine. J Coloproctol 2016; 36(4):231-239.</i></p>



## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA DIGESTÓRIO

O consumo de energia é pré-requisito para a manutenção fisiológica de todo e qualquer organismo vivo. Um consumo metabólico é necessário não somente para manter a homeostase, mas também nos processos de renovações estruturais, no crescimento e desenvolvimento da vida. Para tanto, o organismo deve captar a energia proveniente do meio ambiente e em seguida incorporá-la ao seu meio interno.

Existem inúmeras formas de captação de energia observadas em diferentes organismos. No caso de organismos desenvolvidos, como os seres humanos, a energia proveniente do meio é transformada em energia metabólica por um conjunto de órgãos responsáveis por tal função: o sistema digestório (Douglas, 2006).

O sistema digestório é um sistema composto por um tubo, que se estende desde a boca até o ânus, e por órgãos glandulares anexos (FIGURA 1) (Hall, 2011).

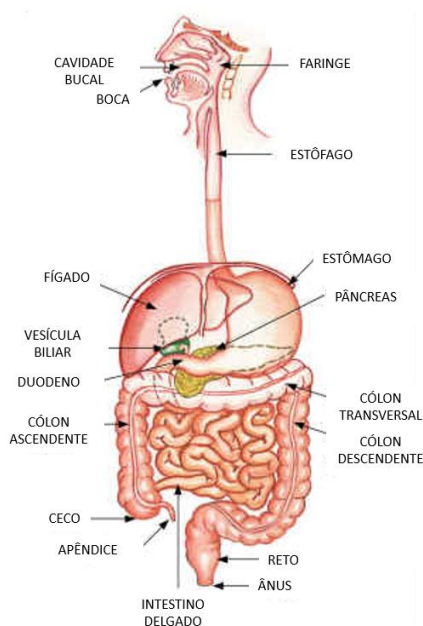


FIGURA 1: Sistema digestório.

FONTE: Bioloja, 2017.

A organização anatômica do sistema digestório pode ser dividida em diferentes segmentos funcionais. As estruturas que fazem parte do tubo são a boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. Associados estão os órgãos glandulares anexos, conectados por ductos pelos quais as secreções escoam, dentre os quais podemos citar as glândulas salivares, o fígado e o pâncreas (Hall, 2011).

Dentre as importantes funções do sistema digestório, a principal é garantir que substâncias altamente complexas e insolúveis sejam transformadas em substâncias simples e solúveis, podendo, assim, serem absorvidas. O processo de digestão é dividido em processos físicos e químicos: a digestão física é associada às importantes propriedades de motricidade presentes no sistema digestório, e a digestão química compõe a ação enzimática à qual o bolo alimentar é submetido ao longo do tubo (Constanzo, 2012).

#### 1.1.1 Anatomia e Fisiologia do Estômago

O estômago é um órgão que tem como principais funções servir de reservatório temporário para os alimentos e promover o início da digestão proteica. No processo digestivo, a distensão mecânica e o estiramento da musculatura lisa estomacal pela chegada do alimento proveniente do esôfago disparam o início da fase gástrica da digestão, sendo também a presença de aminoácidos e oligopeptídeos fatores fundamentais na estimulação da secreção estomacal.

Anatomicamente dividido em cardia, corpo e antro, seu revestimento interno é recoberto por invaginações conhecidas como criptas, que culminam na abertura de ductos pelos quais as glândulas gástricas lançam suas secreções (Aires, 2012).

A parede do estômago é formada pela camada mucosa, que dá origem às criptas gástricas, muscular da mucosa, submucosa, revestida por um tecido conjuntivo denso onde estão presentes vasos sanguíneos e linfáticos, muscular externa, composta por fibras musculares lisas orientadas em três direções

principais, e serosa. A camada muscular externa é representada pela musculatura longitudinal, circular e oblíqua, sendo essa responsável pelos importantes movimentos gástricos que promovem a digestão do alimento proveniente do esôfago. A passagem do alimento do esôfago para o estômago é regulada pela abertura gastroesofageal, mais especificamente pelo esfíncter esofágico inferior, que possibilita a chegada do bolo alimentar ao fundo do estômago (FIGURA 2) (Constanzo, 2012).

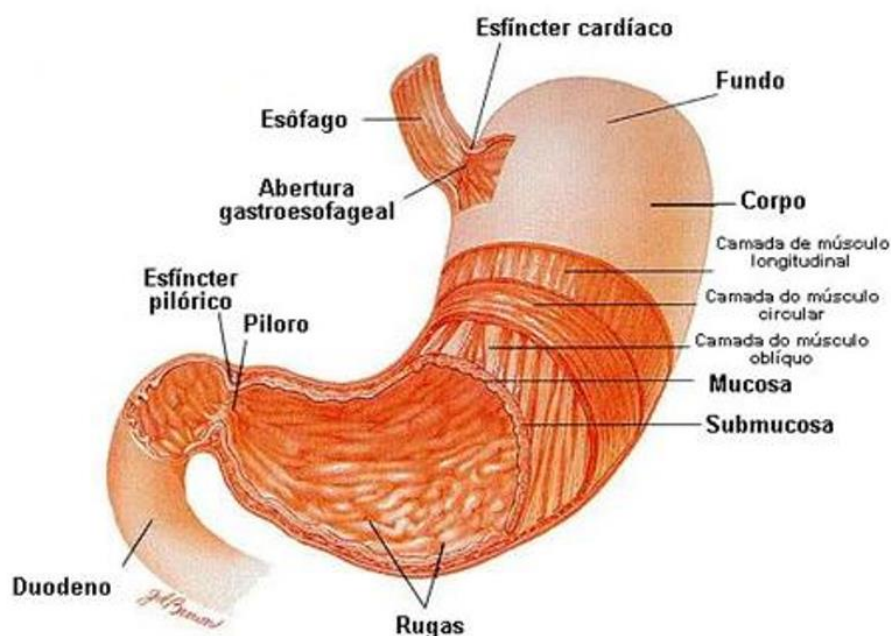


FIGURA 2: Anatomia do estômago.

FONTE: InfoEscola, 2017.

A mucosa gástrica é dividida em três regiões: região da cárdia, localizada abaixo do esfíncter esofágico inferior; região oxíntica ou parietal, localizada acima da incisura gástrica; e região pilórica, localizada abaixo da incisura. Essa divisão corresponde às diferentes estruturas glandulares encontradas, dentre as quais a secreção de ácido clorídrico, fator intrínseco e pepsinogênio destacam-se, devido às importantes funções no processo digestivo.

O alimento deixa o estômago para percorrer o tubo digestório, passando pelo píloro, sendo conduzido ao intestino delgado inicialmente pelo duodeno,

jejuno e finalmente no íleo. A última estrutura pela qual o alimento irá percorrer ao longo do tubo digestório é o intestino grosso (Hall, 2011).

### 1.1.2 Anatomia e Fisiologia do Intestino Grosso

O intestino grosso possui como funções primárias a digestão e absorção de nutrientes remanescentes no tubo, a reabsorção de fluidos e eletrólitos e o armazenamento dos produtos digestivos até o momento de sua eliminação. Ainda, esse órgão é local que abriga uma série de bactérias comensais que caracterizam a microbiota intestinal, que têm como função o auxílio no processo final de digestão, a metabolização de substâncias endógenas, a síntese e vitaminas e uma importante participação no sistema imunológico humano.

O cólon é dividido em cólon ascendente, transversal, descendente e sigmoide (FIGURA 3) (Constanzo, 2012).

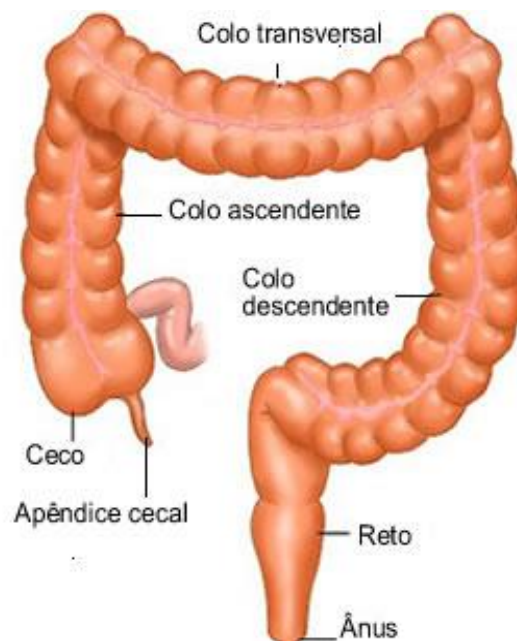


FIGURA 3: Anatomia do intestino grosso

FONTE: Alunos Online, 2017.

O cólon consiste em camadas funcionais com epitélio colunar próximo ao lúmen, posteriormente envolto pela lâmina própria e camadas musculares e

serosa. A musculatura intestinal é composta por camadas contínuas de musculatura circular, que se contrai periodicamente formando as haustrações. Ainda, três bandas de musculatura longitudinal estendem-se ao longo do intestino grosso, sendo essas estruturas conhecidas como tênias.

Após o término do processo da digestão, tanto química quanto física, ao longo do sistema digestório, as frações básicas das substâncias ingeridas são absorvidas da luz intestinal para que ocorra a distribuição dos nutrientes e da energia adquirida para os processos vitais. O caminho percorrido por esses nutrientes é o sistema venoso portal, que os direciona para o fígado para que posteriormente sejam distribuídos para a circulação sistêmica (Aires, 2012).

### 1.1.3 Anatomia e Fisiologia do Sistema Venoso Portal

O sistema venoso portal é constituído por um conjunto de vasos que conduzem o sangue proveniente do tubo digestório, baço, pâncreas e vesícula biliar em direção ao fígado. Esse fluxo sanguíneo representa cerca de 80% do volume de sangue direcionado ao fígado, sendo o restante proveniente da artéria hepática (Miñano e Garcia-Tsao, 2010).

A circulação porta-hepática tem como objetivo direcionar o sangue proveniente das vísceras abdominais e transportá-lo ao fígado, garantindo que todo o sangue venoso, drenado do trato gastrointestinal, passe pelo parênquima hepático antes de atingir a circulação sistêmica. O conjunto de vasos responsáveis por esse transporte anastomosa-se formando a veia porta, estabelecida anatomicamente pela união da veia mesentérica superior, que conduz o fluxo sanguíneo proveniente do estômago, pâncreas, intestino delgado e grosso, com a veia esplênica que, antes de se anastomosar com a veia mesentérica superior, recebe a mesentérica inferior e conduz o fluxo sanguíneo proveniente do baço. Depois de constituída, a veia porta recebe ainda as veias prepilórica e gástrica esquerda (Martinelli, 2004).

Ao chegar ao hilo hepático, esse vaso divide-se em dois ramos: direito e esquerdo. O direito supre o aporte sanguíneo para o lobo direito do fígado, e o

esquerdo supre os lobos esquerdo, caudado e quadrado. O sangue portal é direcionado até os sinusóides, para as veias centrolobulares do fígado, veias hepáticas e finalmente para a veia cava inferior, que desemboca no átrio direito e posteriormente na circulação sistêmica. Dessa forma, todo o fluxo sanguíneo proveniente do sistema digestório, necessariamente, passa pelo fígado antes de cair na grande circulação (FIGURA 4) (Mattos, 2010).

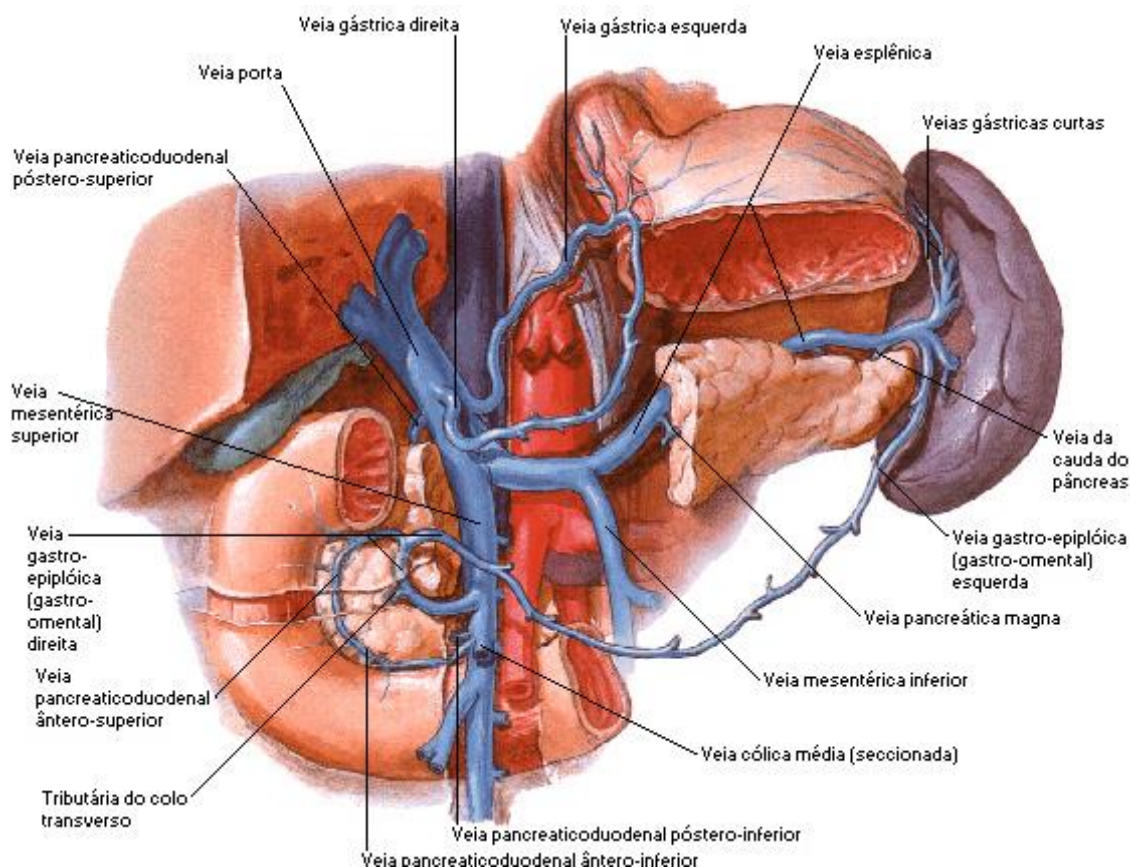


FIGURA 4: Anatomia do sistema venoso portal.  
FONTE: Netter, 2000.

O sistema portal é uma região venosa de alto fluxo sanguíneo (Q), uma vez que grande parte do sangue é direcionado ao fígado utilizando esse conjunto de vasos. Da mesma forma, esse sistema é caracterizado por uma baixa resistência vascular (R), força essa oposta ao grande fluxo de sangue que transita no território portal (Martinelli, 2004).

De acordo com a lei de Ohm, o gradiente de pressão em um sistema vascular ( $\Delta P$ ) é o resultado da interação entre o fluxo sanguíneo e a resistência vascular ( $\Delta P = Q \times R$ ). A fórmula matemática aqui expressa nos possibilita concluir que tanto uma alteração no fluxo (Q), quanto uma alteração na resistência (R), ou ambos, pode acarretar em alteração no gradiente de pressão nesse sistema vascular. No caso do sistema vascular portal, esse gradiente é definido pela diferença de pressão entre a veia porta e a veia cava inferior, sendo esse valor variável entre 5-10 mmHg em adultos, dependendo do método de mensuração empregado (Bosch *et al.*, 2015).

As alterações na resistência vascular ao fluxo sanguíneo podem ocorrer em diferentes locais, podendo estar localizadas antes do fígado (pré-hepáticas), no fígado (intra-hepáticas) ou após o fígado (pós-hepáticas). Ainda, essas alterações podem ocorrer simultânea ou isoladamente, dependendo da origem, causa e dinâmica da variação estrutural primária envolvida (Rajekar *et al.*, 2011).

De acordo com a lei de Poiseuille, o principal fator contribuinte para uma alteração no fluxo sanguíneo é o calibre, ou diâmetro, do vaso (Hall, 2011). No sistema portal, as alterações no tônus vascular podem estar relacionadas ao aumento da liberação de vasodilatadores e/ou redução de vasoconstritores locais. Esse tipo de modificação na musculatura lisa do endotélio vascular acarreta, necessariamente, em um aumento do fluxo sanguíneo local, levando a uma vasodilatação esplâncnica (Iwakiri, 2012).

Dessa forma, qualquer alteração tanto na resistência vascular e/ou no fluxo sanguíneo portal acarretará no aumento de pressão nesse sistema, caracterizando um quadro denominado clinicamente de hipertensão portal.

## 1.2 HIPERTENSÃO PORTAL

A Hipertensão Portal (HP) é uma síndrome clínica caracterizada pelo aumento de pressão no sistema venoso portal, causado por um aumento da resistência vascular e/ou do fluxo sanguíneo (Lee *et al.*, 2016). O gradiente de pressão entre a veia porta e a veia cava inferior eleva-se persistentemente entre 1-5 mmHg acima dos valores fisiológicos, causando um distúrbio hemodinâmico acompanhado de graves consequências clínicas (Bosch *et al.*, 2015).

Dentre os mecanismos considerados desencadeantes para este quadro, o aumento da resistência vascular é considerado o mecanismo inicial na patogênese da hipertensão portal, seguido pelo conseqüente aumento do fluxo sanguíneo (Garbuzenko, 2015).

O aumento da resistência vascular é desencadeado necessariamente pelo surgimento de um obstáculo anatômico, sem qualquer nível do sistema portal. Este obstáculo contribui para a oclusão do alto fluxo de sangue na circulação esplâncnica e inicialmente para o aumento da pressão venosa portal (Martinelli, 2004).

O obstáculo ao fluxo sanguíneo pode estar localizado em qualquer nível do sistema venoso portal. A causa mais frequente é, de fato, a obstrução intra-hepática. Nessa situação, o aumento da resistência vascular é principalmente causado pela distorção da arquitetura hepática devido à fibrose, bem como pelo surgimento de nódulos regenerativos locais. No entanto, existem outras situações primárias as quais podem desencadear o quadro de HP, dependendo da localização do obstáculo anatômico ao fluxo sanguíneo (FIGURA 5) (Rajekar *et al.*, 2011).



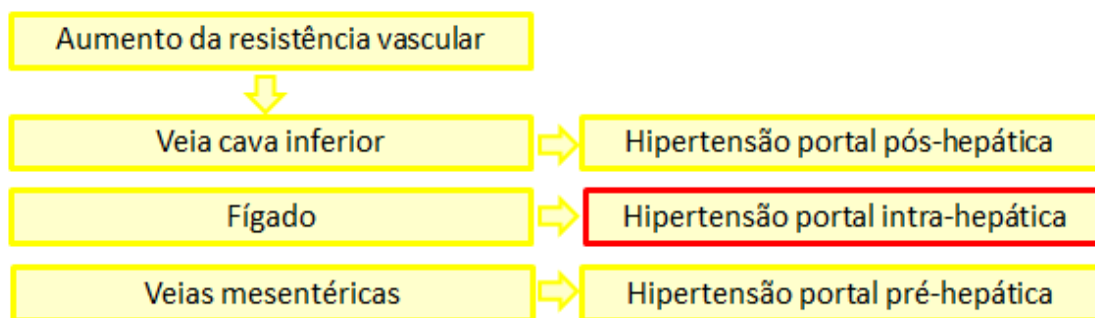


FIGURA 5: Locais de aumento da resistência vascular.  
 FONTE: Adaptado de Martinelli, 2004.

As alterações de resistência vascular decorrentes do impedimento de um fluxo sanguíneo eficaz no sistema venoso portal disparam mecanismos vasculares de alteração de calibre, caracterizando uma vasodilatação esplâncnica progressiva. Os principais estímulos para a secreção de moléculas vasodilatadoras são o estresse de cisalhamento e a liberação de substâncias vasoativas, como o óxido nítrico, que irão contribuir para o aumento do calibre vascular e conseqüentemente para o aumento do fluxo de sangue, em uma tentativa de descompressão no território esplâncnico (Bolognesi *et al.*, 2014).

A tentativa de descompressão neste local é, de fato, o surgimento de uma circulação colateral, que tem por objetivo desviar o sangue do local de obstrução e levá-lo diretamente para a circulação sistêmica. A dilatação e a reperfusão de vasos pré-existentes associadas à liberação de fatores angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) promovem um aumento no fluxo sanguíneo portal, contribuindo para a descompressão do sistema (Fernandez *et al.*, 2005).

No entanto, esses mecanismos compensatórios acabam contribuindo para a patogênese da hipertensão portal. O desvio sanguíneo do território esplâncnico do fígado acaba possibilitando a circulação de substâncias não detoxificadas, como a amônia, podendo causar o quadro de encefalopatia hepática. Em um paciente com HP, este metabólito contorna o fígado através de shunt portossistêmico e atinge os astrócitos cerebrais, onde é metabolizada causando edema cerebral, estresse oxidativo (EO), nitrosativo e disfunção mitocondrial

astrocitária (Häussinger *et al.*, 2000). Ainda, o surgimento desta circulação colateral hiperdinâmica é também responsável pelo extravasamento de líquido intravascular para a cavidade abdominal, quadro esse denominado de ascite (Sauerbruch e Trebicka, 2014).

Finalmente, atualmente considera-se a hipertensão portal uma síndrome, uma vez que a progressiva vasodilatação acomete múltiplos órgãos (Bosch *et al.*, 2015). O surgimento de varizes pode ocorrer em qualquer segmento do tubo digestório, sendo eventualmente a dilatação vascular visível a olho nu, como no caso do quadro denominado clinicamente “*caput medusae*” (cabeça de medusa) (Figura 6). Este representa um dos sinais cardeais da hipertensão portal, e seu aparecimento é decorrente da formação de colaterais portossistêmicos cutâneos, e distensão e engurgitamento das veias paraumbilicais (Sharma e Raina, 2015).



Figura 6: *Caput medusae*.  
Fonte: Sharma e Raina, 2015.

A dilatação vascular é sistêmica e especialmente protuberante na região abdominal. Essas complicações vasculares representam uma das principais consequências da hipertensão portal, podendo causar sangramento gastrointestinal devido ao rompimento das varizes. Em locais do sistema digestório, como o estômago e o intestino, essa dilatação caracteriza os quadros

de Gastropatia e Colopatia da Hipertensão Portal, respectivamente (Al-Busafi *et al.*, 2012).

### 1.2.1 Gastropatia da Hipertensão Portal

O quadro de Gastropatia da Hipertensão Portal (GHP) é uma importante causa de morbidade em pacientes com HP cirrótica ou não cirrótica, sendo sua prevalência variável entre 20% a 75%, e diretamente relacionada com a severidade da hipertensão portal (Gjeorgjievski e Cappell, 2016).

Atualmente, as varizes gástricas e esofágicas são consideradas as mais relevantes clinicamente em pacientes com HP, sendo responsáveis por sangramento agudo gastrointestinal e um elevado risco de morte (Bosch *et al.*, 2015).

O sangramento de varizes gástricas devido a GHP é presente em cerca de 5-10% dos pacientes, sendo o risco de ruptura vascular primária inferior ao risco das varizes esofágicas. O risco de ruptura vascular recorrente é dependente da localização das varizes, sendo aquelas localizadas no fundo gástrico as mais frequentemente associadas à hemorragia (Biecker, 2013). Ainda, a GHP é tipicamente localizada nesta região, bem como na parte superior do corpo do estômago, fato esse que aumenta o risco de sangramento nesses pacientes quando considerado um critério anatômico (Ripoll e Garcia-Tsao, 2010).

A GHP é histologicamente caracterizada pela ectasia e hiperemia das veias e capilares da mucosa e submucosa, sendo o seu diagnóstico feito através de endoscopia. Diversas tentativas de classificação desta doença foram feitas, inclusive utilizando uma série de termos, como gastrite erosiva, erosões gástricas agudas e ectasia vascular *per se*. No entanto, atualmente, a classificação da NIEC (*North Italian Endoscopic Club for the study and treatment of esophageal varices*) é a mais aceita (Spina *et al.*, 1994), a qual caracteriza o quadro em gastropatia moderada ou grave. No caso de moderada, a GHP compreende um quadro de padrão mosaico ou couro-de-cobra, enquanto a grave é caracterizada

por manchas avermelhadas (“*red spots*”) que podem ou não apresentar sangramento espontâneo (FIGURA 7) (Gin-Ho, 2009).

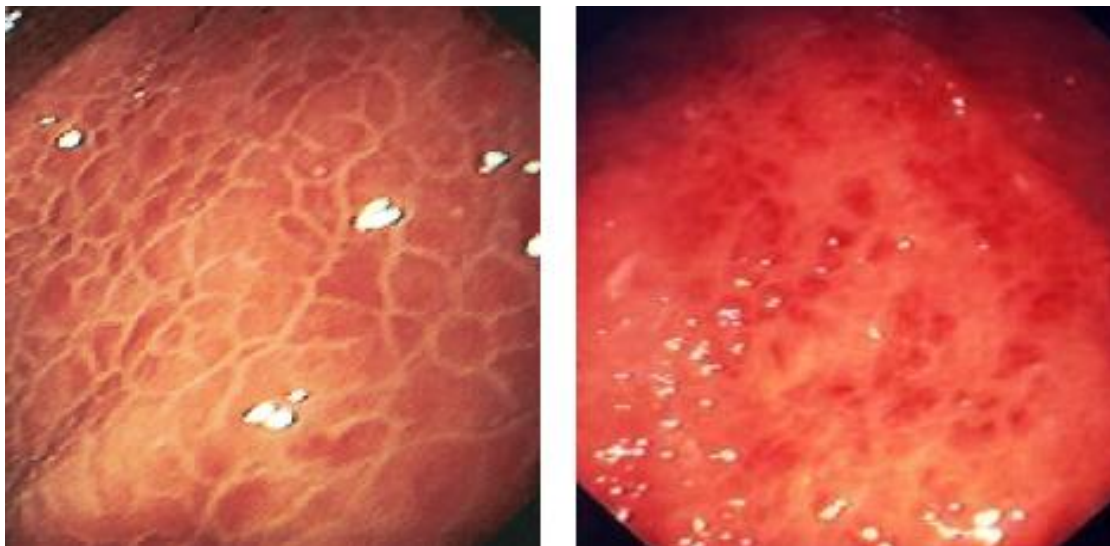


FIGURA 7: Gastropatia moderada e grave  
FONTE: Hepcentro, 2017.

As alterações hemodinâmicas decorrentes do quadro de HP causam uma mudança no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, levando à ativação de citocinas e fatores de crescimento que promovem o estabelecimento do quadro de GHP (Ohta *et al.*, 2002). Até agora, inúmeros mecanismos vêm sendo investigados na tentativa de elucidar a patogênese da GHP. Porém os dados são ainda inexatos. O tratamento é geralmente focado na redução da pressão portal, com a intenção de prevenir o curso de desenvolvimento da doença. No entanto, praticamente nenhum dado na literatura nos mostra se o tratamento profilático relacionado ao sangramento das varizes gástricas é eficaz (Biecker, 2013).

### 1.2.2 Colopatia da Hipertensão Portal

As alterações hemodinâmicas e o desenvolvimento dos colaterais portossistêmicos na hipertensão portal são iniciados pela vasodilatação esplâncnica e a neovascularização decorrentes da hipóxia na mucosa intestinal (Garbuzenko, 2015). Assim, o intestino é também um órgão acometido pela

hipertensão portal, no quadro recentemente denominado Colopatia da Hipertensão Portal (CHP).

O termo foi criado para descrever as alterações consideradas muito semelhantes àsquelas da gastropatia, porém encontradas no intestino grosso de pacientes com hipertensão portal. Inicialmente, o termo foi utilizado em 1991, em um estudo que demonstrou que na endoscopia de pacientes com HP era possível observar ectasias vasculares colônicas e varizes retais (Kozarek *et al.*, 1991).

A CHP é caracterizada por lesões vasculares, eritema, manchas vermelho-cerejas (“*cherry-red spots*”) e telangiectasias na mucosa do cólon desses pacientes. A prevalência em pacientes cirróticos varia entre 25-70%, sendo a presença de varizes colônicas verificada em 4-40% dos casos e o sangramento estimado em 0-9% (Urrunaga e Rockey, 2014).

O diagnóstico é endoscópico, onde são observadas lesões avermelhadas e ligeiramente volumosas na mucosa intestinal. Varizes retais também podem ser observadas, bem como veias submucosas dilatadas e lesões vasculares de coloração vermelho-cereja muito similares àsquelas encontradas no estômago de pacientes com HP (FIGURA 8) (Urrunaga e Rockey, 2014).



FIGURA 8: Colopatia.

FONTE: Adaptado de Urrunaga e Rockey, 2014.

Não existe um consenso na literatura em relação à classificação da Colopatia da Hipertensão Portal (Diaz-Sanchez *et al.*, 2009). Segundo trabalho

publicado recentemente, uma importante classificação foi feita por Mayeri et al. (2010), utilizando cápsulas endoscópicas para classificar a CHP em *red spots*, angioectasias, varizes do intestino delgado e lesões inflamatórias (Jeon e Kim, 2016).

A Colopatia é usualmente assintomática, e o sangramento crônico e agudo é ocasionalmente reportado. No entanto, dados na literatura são escassos, e a patogênese da CHP permanece pouco conhecida.

Evidências que suportem as estratégias terapêuticas disponíveis para o tratamento desta doença ainda são muito limitadas. Não há tratamento considerado “padrão”, e a maioria das recomendações disponíveis é baseada em estudos de caso. Ensaio direcionados para a profilaxia do sangramento intestinal ainda não foram desenvolvidos, assim, a melhor estratégia ainda é desconhecida (Urrunaga e Rockey, 2014).

### 1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERTENSÃO PORTAL

O uso de modelos animais na ciência possibilitou, ao longo dos anos, inúmeros avanços no campo da patologia. No caso da hipertensão portal, claramente, esse avanço foi capaz de responder a algumas perguntas antes incompreendidas. Por exemplo, o fato de que tanto a resistência vascular quanto o aumento do fluxo sanguíneo contribuem igualmente para o estabelecimento e manutenção da doença somente foi averiguado quando um método experimental, eficaz em conduzir estudos hemodinâmicos detalhados, foi proposto (Abralde et al., 2006).

A escolha do modelo animal deve obedecer a critérios que irão contemplar a conquista dos objetivos propostos pelo autor do trabalho, bem como deve ter um enfoque na etiologia da hipertensão portal que será estudada. Dentro da fisiopatologia da hipertensão portal, existem diversas possibilidades de modelos experimentais disponíveis de acordo com os diferentes objetivos apresentáveis.

Modelos de hipertensão portal intra-hepática, tanto pré-sinusoidal, sinusoidal ou pós-sinusoidal, são disponíveis quando os objetivos giram em torno de estudar as alterações hemodinâmicas decorrentes da cirrose propriamente dita. Ou seja, hipertensão portal intra-hepática. São exemplos a administração aguda de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) e ligadura de ducto biliar comum, ambos já desenvolvidos pelo presente grupo de pesquisa (Vieira *et al.*, 2011; Bona *et al.*, 2012). O primeiro modelo manifesta hipertensão portal, shunt- portossistêmico e circulação hiperdinâmica após 12-15 semanas de administração (Vorobioff *et al.*, 1983) e o segundo manifesta hipertensão portal severa em 4 semanas após a intervenção cirúrgica (Lee *et al.*, 1986).

Para estudar a hipertensão pós-hepática, poucos modelos foram descritos na literatura. A dificuldade de oclusão da veia cava inferior acaba por minimizar a reprodução do modelo. Dessa forma, este não é amplamente utilizado (Abralde *et al.*, 2006).

No caso da hipertensão portal pré-hepática, o modelo de ligadura parcial da veia porta é o mais descrito na literatura, devido a sua fácil reprodução, baixo custo e alta reprodutibilidade. Além disso, o modelo possibilita o desenvolvimento da hipertensão portal em um curto espaço de tempo, sendo a síndrome hipertensiva, com circulação hemodinâmica e shunt portossistêmico totalmente estabelecidos em 7 dias após a intervenção cirúrgica (Sikuler *et al.*, 1985). Nosso grupo de pesquisa já utilizou este modelo para estudar a hipertensão portal pré-hepática. Sendo assim, temos experiência no desenvolvimento e curso deste experimento (Moreira *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2013).

Dessa forma, optamos por utilizar no presente trabalho o modelo experimental de ligadura parcial da veia porta para estudar as alterações hemodinâmicas, bioquímicas e moleculares decorrentes da hipertensão portal pré-hepática.

### 1.3.1 Ligadura Parcial da Veia Porta

O modelo de LPVP foi descrito em 1985 por Sikuler et al., e desde então vem sendo amplamente utilizado para estudar a hipertensão portal pré-hepática em animais como coelhos, camundongos e ratos, como no caso deste presente trabalho. Os animais submetidos a esse modelo não possuem nenhuma alteração hepática, manifestando somente a circulação hiperdinâmica e as manifestações hemodinâmicas decorrentes da mesma.

A ligadura parcial da veia porta trata-se de uma oclusão parcial da veia porta, estrutura vascular de elevado fluxo sanguíneo, responsável por conduzir o sangue proveniente das vísceras abdominais para o fígado. Essa oclusão é feita utilizando uma agulha, com calibre previamente estipulado, sendo quanto maior o calibre desta, menor a oclusão venosa que irá se manifestar no modelo experimental. Assim, o grau de severidade das manifestações hemodinâmicas pode ser determinado utilizando agulhas de diferentes calibres: 16 G, 18 G ou 20 G, por exemplo (FIGURA 9).

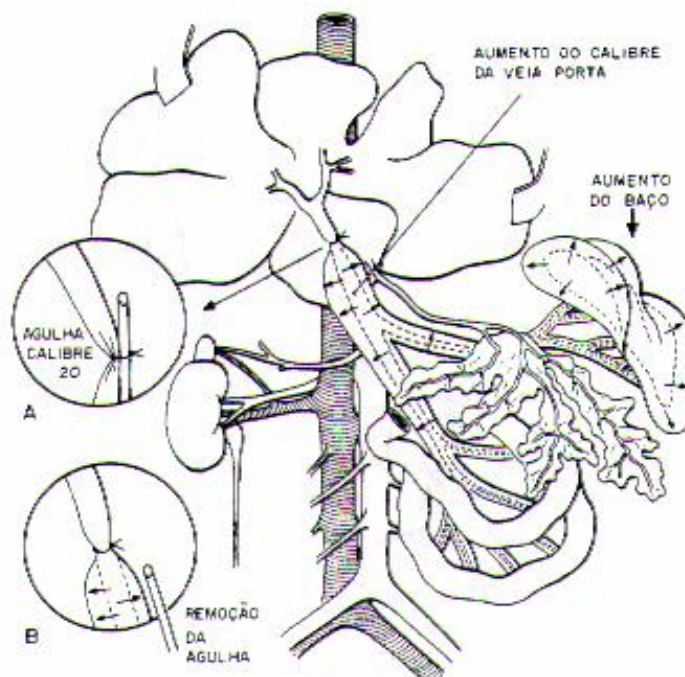


FIGURA 9: Modelo de ligadura parcial da veia porta (LPVP).  
FONTE: Sikuler *et al.*, 1985.



O *shunt*-portossistêmico é detectável em 2 dias, atingindo cerca de 100% em 7 dias. A vasodilatação mesentérica manifesta-se em torno do 5º dia após cirurgia e no 7º dia os animais já manifestam a completa hipertensão portal pré-hepática (Sikuler *et al.*, 1985).

Dessa forma, o presente trabalho utilizou este modelo, considerando os animais porta-hipertensos em 7 dias após a intervenção cirúrgica inicial.

#### 1.4 ESTRESSE NITROSATIVO E OXIDATIVO NA HIPERTENSÃO PORTAL

O fato de que o estresse oxidativo e nitrosativo estão relacionados à etiologia de inúmeras doenças já é muito bem estabelecido na literatura. Ambos resultantes de um desequilíbrio entre os agentes antioxidantes/pró-oxidantes, a contínua produção de Espécies reativas de oxigênio (ERO) e Espécies reativas de nitrogênio (ERN), bem como a redução na atividade das defesas antioxidantes, são apontados como responsáveis pelo desenvolvimento destes quadros (Kurutas, 2015).

Na Hipertensão Portal, o Estresse nitrosativo está relacionado com a super-produção de óxido nítrico (NO) ao longo do desenvolvimento da circulação hiperdinâmica (Iwakiri e Kim, 2015). Da mesma forma, o Estresse oxidativo é frequentemente apontado como mediador central na patogênese da doença (Gjeorgjievsk e Cappell, 2016). Assim, ambos são atualmente considerados fatores desencadeantes e/ou agravantes no desenvolvimento desta doença.

##### 1.4.1 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula gasosa encontrada no ar atmosférico em baixas concentrações, que possui papel pleiotrópico nos sistemas biológicos. O NO está relacionado com a regulação do tônus vascular e neurotransmissão via guanilil ciclase, com a tradução do mRNA e transcrição gênica, e com modificações proteicas pós-transdutoras, entre outros. Por outro lado, esta molécula está intimamente envolvida com processos de nitração, danos

oxidativos e S-nitrosilação de proteínas, lipídios e DNA, sendo associada diretamente ao estresse nitrosativo (Förstermann e Sessa, 2012).

A síntese do NO é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS); para tanto, ocorre a oxidação da L-arginina convertida em L-citrulina e óxido nítrico. A NOS possui três isoformas diferentes, que são agrupadas em duas principais categorias: NOS constitutiva (cNOS) e NOS induzível (iNOS), diferindo em relação ao peso molecular, forma de ativação e capacidade de síntese (FIGURA 10) (Marletta, 1993).

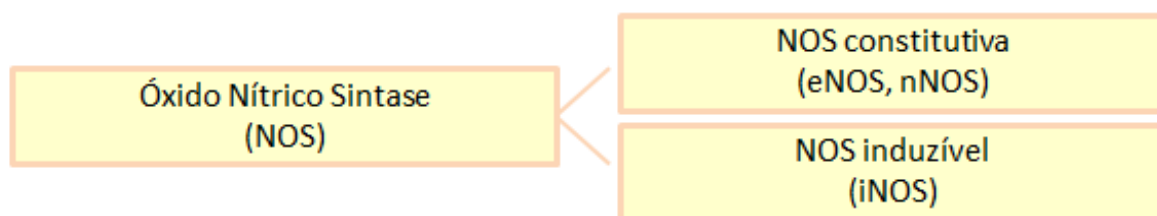


FIGURA 10: Isoformas da NOS.  
FONTE: Adaptado de Dusse *et al.*, 2003.

Na categoria da NOS constitutiva, encontramos a NOS neuronal (nNOS), normalmente presente nos neurônios; e a NOS endotelial (eNOS), predominante nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas. Ambas são expressas continuamente, ou seja, apresentam uma concentração basal na ausência de agentes indutores (Dusse *et al.*, 2003).

Já na categoria da NOS induzível, a iNOS não é detectada em condições basais, requerendo para sua expressão e atividade do aumento da síntese protéica. Endotoxinas bacterianas, citocinas como TNF- $\alpha$ , interleucinas (IL-1 $\beta$ ) ou imunoglobulinas (IG-g), induzem a sua síntese nas 2-4 primeiras horas após o estímulo agressor, e esta pode ficar ativa por até 20 horas posteriores a sua síntese (Cerqueira e Yoshida, 2002).

Quanto à ação de cada uma das NOS, sabe-se que a nNOS regula a transmissão neuronal e atua como neurotransmissor; a eNOS favorece a redução da pressão sanguínea e auxilia na inibição da agregação plaquetária; e a iNOS

está relacionada aos processos de defesa do organismo (Liaudet *et al.*, 2000). Por outro lado, em altas concentrações e através da formação de trióxido de dinitrogênio ( $N_2O_3$ ) ou peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), o NO passa a agir como espécie ativa de nitrogênio, responsável por inúmeras ações citotóxicas (Iwakiri e Kim, 2015). Assim, os efeitos fisiológicos e fisiopatológicos do óxido nítrico estão relacionados aos seus níveis de concentração, sendo os níveis de produção de óxido nítrico na hipertensão portal intimamente relacionados com o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica decorrente do aumento da pressão portal.

#### 1.4.1.1 Óxido Nítrico na Gastropatia da Hipertensão Portal

O progressivo aumento da pressão no território portal dispara mecanismos compensatórios de vasodilatação, mediados principalmente pelo óxido nítrico, na tentativa de descomprimir o território esplâncnico previamente obstruído. O aumento da produção de NO contribui, assim, para o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica e agravamento do quadro geral do paciente (Hu *et al.*, 2013). Ainda, a liberação de agentes angiogênicos como o VEGF também contribuem para o remodelamento vascular na GHP (Marques *et al.*, 2013).

Pacientes com hipertensão portal frequentemente apresentam níveis séricos de NO elevados. Esses valores acompanham os crescentes valores de pressão portal, demonstrando a importância desta molécula na modulação vascular e vasodilatação esplâncnica (Gjeorgjievski e Cappell, 2016).

A vasodilatação, ou seja, o aumento do calibre vascular no estômago dos pacientes com GHP é também relacionado à superprodução de óxido nítrico. Nesse âmbito, tanto a NOS constitutiva (cNOS), mais especificamente a eNOS, quanto a induzível (iNOS) foram associadas na literatura como contribuintes na patogênese da gastropatia da hipertensão portal (Gjeorgjievski e Cappell, 2016).

O óxido nítrico pode atuar tanto como oxidante como redutor, e sua oxidação produz nitritos e nitratos. Ainda, o NO pode reagir facilmente com o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), gerando produtos intermediários conhecidos como

espécies reativas de nitrogênio, responsáveis por uma série de danos à homeostase do nosso organismo (Hu *et al.*, 2013). Dentre esses produtos, é importante destacar o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), devido ao seu papel central no estresse nitrosativo estabelecido na gastropatia da hipertensão portal. O peroxinitrito produzido na reação acima descrita reage com resíduos de tirosina e tirosina livre, produzindo um composto denominado nitrotirosina (NTT), sendo esse atualmente considerado um excelente marcador de altos níveis de óxido nítrico (Licks *et al.*, 2015).

#### 1.4.1.2 Óxido Nítrico na Colopatia da Hipertensão Portal

Embora ainda haja muitas questões a serem elucidadas mediante a patogênese da CHP, a ectasia capilar da mucosa colônica é considerada uma importante alteração presente nos pacientes acometidos por esse quadro (Urrunaga e Rockey, 2014).

A dilatação, ou ectasia vascular, da mesma forma que na GHP, é associada com a superprodução de óxido nítrico no território esplâncnico. A contribuição de cada isoforma da NOS na patogênese da CHP é dependente de inúmeros fatores ainda em discussão; no entanto, a síntese aumentada da iNOS na vasculatura mesentérica parece contribuir, de fato, com as alterações intestinais presentes na síndrome da hipertensão portal, além de estar relacionada ao quadro inflamatório estabelecido no intestino (Aller *et al.*, 2005).

#### 1.4.2. Radicais Livres e Sistema Antioxidante

O oxigênio ( $\text{O}_2$ ) é um elemento essencial, cujo aparecimento na atmosfera terrestre parece estar relacionado não somente com o abrupto início da vida animal na Terra, mas também com a evolução das espécies. Em organismos aeróbicos, o  $\text{O}_2$  é utilizado como aceptor final de elétrons, permitindo uma grande produção de energia na respiração celular devido ao seu grande potencial eletroquímico (Ribeiro *et al.*, 2005).

No entanto, esta molécula parece exercer um papel pleiotrópico na manutenção da vida, já que em determinadas situações, o oxigênio é considerado tóxico, e potencialmente lesivo para as células, órgãos e sistemas (Meneghini, 1987).

A molécula de oxigênio, em seu estado fundamental, é considerada um agente oxidante, devido ao fato de ser um birradical que possui dois elétrons desemparelhados no orbital. Durante os processos oxidativos biológicos, como a própria respiração celular mitocondrial, o processo de transferência de elétrons pode gerar as espécies reativas de oxigênio (ERO) através de intermediários gerados durante o processo de redução parcial do oxigênio (Zorov *et al.*, 2014).

Acredita-se que mais de 90% da geração de ERO em organismos eucariontes ocorra na cadeia transportadora mitocondrial de elétrons. No final da respiração mitocondrial, o  $O_2$  é reduzido à água ( $H_2O$ ). Porém, por receber apenas um elétron de cada vez, a sua redução ocorre de forma parcial, gerando espécies reativas como o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Ao se adicionar um hidrogênio ao ânion superóxido, este é reduzido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Se um terceiro elétron for transferido, ocorrerá a formação do radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). Assim, a formação de espécies reativas de oxigênio deve-se ao fato de o  $O_2$  se reduzir à água de forma monovalente, permitindo a geração de metabólitos intermediários durante o processo, os quais são altamente reativos (FIGURA 11) (Halliwell, 2007).

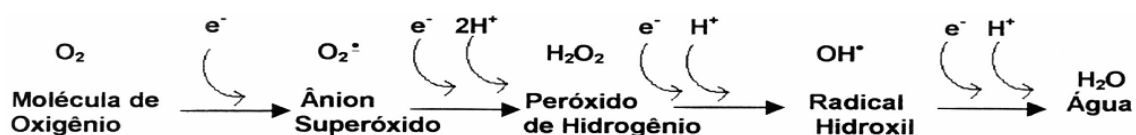


FIGURA 11: Formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres.  
 FONTE: Adaptado de Halliwell, 2007.

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 (Halliwell, 2007). Esse elétron confere a essas moléculas uma alta reatividade, devido a sua tendência de adquirir um elétron para estabilizar esse orbital. Isso ocorre através da remoção de elétrons de

moléculas quaisquer, como proteínas, lipídios, glicídios e ácidos nucleicos (Phaniendra *et al.*, 2015).

Exemplos de radicais livres são o radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ), o ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ) e o óxido nítrico (NO), que podem ser formados durante o metabolismo de qualquer célula, pela perda de elétrons de um não radical ou pelo ganho de um elétron por um não radical. Esses 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 (Meneghini, 1987).

O estresse oxidativo é caracterizado por um aumento das espécies reativas de oxigênio em relação aos seus níveis fisiológicos, levando a um desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes (Halliwell, 2007). Esse desequilíbrio apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação de lipídios de membrana, a agressão às proteínas dos tecidos e membranas, enzimas, carboidratos e DNA. Sendo assim, está relacionado a inúmeras doenças, inclusive as hepáticas, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (Li *et al.*, 2015).

#### *1.4.2.1 Radicais Livres na Gastropatia da Hipertensão Portal*

##### *1.4.2.1.1 Peroxidação de lipídeos na Gastropatia*

As anormalidades gástricas presentes na GHP, como o aumento da friabilidade da mucosa, dilatação vascular anormal e lesões que não cicatrizam facilmente são frequentemente associadas ao quadro de estresse oxidativo (Onuigbo *et al.*, 2016).

O aumento da produção de radicais livres está relacionado à gastropatia, bem como os danos associados a essa super-produção de agentes pró-oxidantes. Os peróxidos de lipídeo são produtos da oxidação de ácidos graxos polinsaturados presentes nos fosfolipídeos da membrana das células, e são excelentes marcadores de danos lipídicos relacionados ao estresse oxidativo. Para avaliar a presença destes produtos, a técnica laboratorial que detecta o nível de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é amplamente

utilizada, sendo esse marcador correlacionado diretamente com o dano e a lesão no tecido analisado (Suzuki *et al.*, 2012).

Nosso grupo de pesquisa utiliza frequentemente esta técnica para avaliar o nível de lipoperoxidação em diferentes tecidos como fígado, intestino, pulmão e estômago. No caso do estômago, trabalhos anteriores detectaram altos níveis de estresse oxidativo e peroxidação lipídica em modelo de LPVP (Moreira *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2013; Licks *et al.*, 2014).

#### 1.4.2.2. Defesas Antioxidantes na Gastropatia

##### 1.4.2.2.1 Superóxido dismutase e NAD(P)H quinona oxidorreductase 1

Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas são essenciais na manutenção celular em uma situação de estresse oxidativo. A enzima superóxido dismutase converte radicais superóxidos em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, sendo considerada a primeira linha de defesa antioxidante endógena contra agentes pró-oxidantes. Alterações na sua atividade são consideradas um indicativo de maior produção de ânion superóxido, sendo essa situação condizente com um quadro de estresse oxidativo (Perry *et al.*, 2010).

Na gastropatia, essa enzima vem sendo associada com o quadro de dano gástrico oxidativo implicado nesta patologia, demonstrando sua atividade frequentemente alterada quando avaliada em modelos animais de hipertensão portal (Marques *et al.*, 2013; Licks *et al.*, 2015).

A NAD(P)H quinona oxidorreductase 1 (NQO1) é outra importante molécula antioxidante implicada na redução direta do ânion superóxido. Embora menos eficaz que a SOD, atua como *scavenger* de radicais livres. O gene NQO1 codifica enzimas responsáveis por catalisar a redução de elétrons e prevenir formação de espécies reativas de oxigênio (Moreira *et al.*, 2015). Sendo assim, a alteração de sua expressão demonstra uma ativação da via antioxidante relacionada com a síntese de enzimas detoxificantes (FIGURA 12) (Ma, 2013).

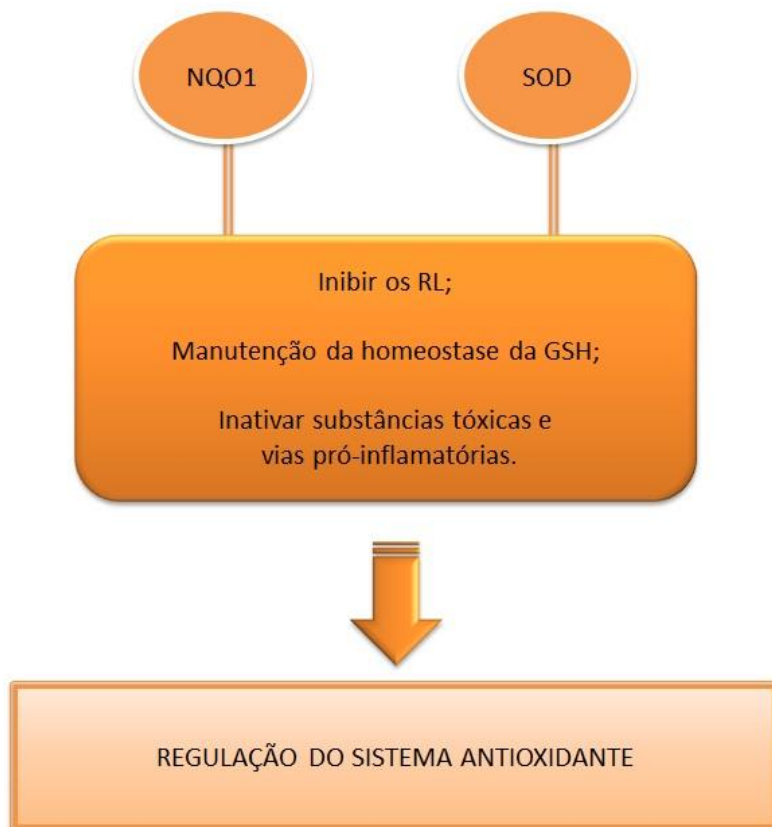


FIGURA 12: Ação da SOD e NQO1.  
FONTE: Adaptado de Halliwell, 2007.

#### 1.4.2.2.2. *Glutathione Peroxidase*

A ação da SOD como primeira linha de defesa enzimática contra a ação dos radicais livres promove a geração de peróxido de hidrogênio que, apesar de não ser um radical, reage facilmente formando o radical hidroxila, molécula potencialmente lesiva. Assim, à remoção desses produtos cabe uma segunda linha de defesa enzimática, as enzimas Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). A CAT possui mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (Halliwell, 2007).

A enzima glutathione peroxidase (GPx) fica localizada no citosol e na matriz mitocondrial, e 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) (FIGURA 13) (Halliwell, 2007).

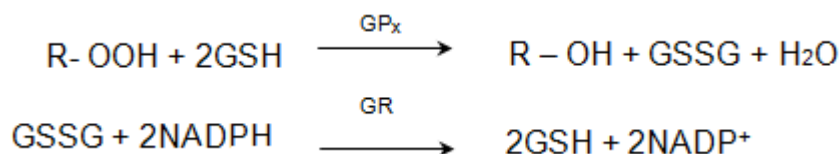


FIGURA 13: Ação da glutathiona peroxidase (GPx).  
 FONTE: Adaptado de Halliwell, 2007.

Uma vez que a geração de espécies reativas de oxigênio é muito bem estabelecida na gastropatia da hipertensão portal, trabalhos descritos na literatura apontam a influência do uso de antioxidantes exógenos na modulação das enzimas antioxidantes, como a GPx (Licks *et al.*, 2014). A administração de determinados antioxidantes exógenos aponta um aumento na atividade da Glutathiona Peroxidase, sendo essa capaz de reverter danos gástricos implicados no quadro da GHP (Gjeorgjievski e Cappell, 2016).

#### 1.4.2.3 Radicais Livres na Colopatia da Hipertensão Portal

##### 1.4.2.3.1 Peroxidação de Lipídeos na Colopatia

A vasodilatação progressiva no território esplâncnico é responsável pelo surgimento de varizes localizadas no intestino de pacientes com hipertensão portal. As alterações intestinais presentes na HP ainda estão sendo elucidadas, no entanto, o envolvimento do estresse oxidativo neste quadro clínico está cada vez mais nítido.

As lesões observadas em pacientes com CHP são semelhantes àquelas encontradas na colite inflamatória crônica, sendo definidas como granulosas, difusas, edêmicas e friáveis em diferentes estágios. A colite é doença relacionada intimamente ao estresse oxidativo (Mekaroonkamol *et al.*, 2015), e nosso grupo

de pesquisa já avaliou previamente os níveis de lipoperoxidação por TBARS em intestino de animais submetidos a modelo experimental de colite ulcerativa (Fillmann *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2014).

Dados na literatura são escassos; porém, uma vez que estabelecemos que na hipertensão portal ocorre uma super-produção de óxido nítrico e este é uma importante fonte de geração de radicais livres, podemos afirmar que os danos gerados por uma situação de estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica (LPO), são muito plausíveis. Ainda, a relação da Colopatia com o estresse oxidativo segue uma estreita relação com o processo inflamatório, uma vez que o estresse mecânico causado pelo aumento do fluxo sanguíneo dispara a secreção de substâncias vasoativas, citocinas e fatores de crescimento, sendo esse um fator desencadeante para a inflamação local ou generalizada. Células inflamatórias também são importantes fontes para a geração de espécies reativas de oxigênio. Assim, danos oxidativos e inflamatórios atuam sinergicamente nesta patologia (Aller *et al.*, 2007).

Eventos oxidativos são presentes em uma situação de estresse oxidativo sistêmico. Ainda, há uma estreita relação de estresse oxidativo e diferentes doenças intestinais, sendo eventos como a peroxidação lipídica já previamente evidenciados em trabalhos que estudaram a colite isquêmica (Jarry *et al.*, 2006) e isquemia e reperfusão intestinal, através da técnica de TBARS (Zabot *et al.*, 2014).

#### 1.4.2.4 Defesas Antioxidantes na Colopatia

##### 1.4.2.4.1 Superóxido dismutase

O trato gastrointestinal é uma importante fonte de geração de radicais livres. Dessa forma, o entendimento da resposta fisiológica induzida pelo estresse oxidativo é de extrema importância, inclusive em doenças gastrointestinais (Bhattacharyya *et al.*, 2014).

A atividade da SOD apresenta-se modificada na presença de radicais livres. Esse dado demonstra a importância das enzimas antioxidantes em situações de estresse oxidativo. No intestino, essa enzima foi apontada como fator-chave na redução de radicais superóxidos, estando alterada em concordância com o aumento de estresse oxidativo no tecido intestinal, tanto em modelo de colite (Hartmann *et al.*, 2012) quanto de ligadura parcial da veia porta (Licks *et al.*, 2016).

#### 1.4.2.4.2 *Glutathione Peroxidase*

Uma concentração fisiológica de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio é modulada pela atividade das enzimas antioxidantes, como a GPx. Em situações não fisiológicas, como um quadro de estresse oxidativo, observa-se a alteração da atividade desta enzima, agindo como protetora contra a ação de diferentes espécies reativas de oxigênio (Halliwell, 2007).

A atividade enzimática da GPx requer glutathione como um doador de prótons, e diversos trabalhos apontam que uma suficiente concentração de glutathione nas células epiteliais do cólon e jejuno podem prevenir a degradação tecidual. Dessa forma, uma alteração na atividade desta enzima pode contribuir para o agravamento do estresse oxidativo e, portanto, do quadro geral (Hartmann *et al.*, 2012; Piechota-Polanczyk e Fichna, 2014).

## 1.5 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

### 1.5.1 Fator Nuclear-*κ*B

O Fator nuclear-*κ*B (NF-*κ*B) é um heterodímero constituído de duas subunidades, p65 e p50, com capacidade de se ligar a uma sequência específica de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve  $\kappa$  das moléculas de anticorpo das células B (Sen e Baltimore, 1986). Inúmeros genes implicados em importantes processos celulares são regulados por este fator. Dessa forma,

esta molécula é considerada como um importante alvo terapêutico em diferentes doenças (Glezera *et al.*, 2000).

O fator NF- $\kappa$ B localiza-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória, o I $\kappa$ B, que impede a sua translocação para o núcleo. Para que ocorra a sua ativação, é necessária a fosforilação e degradação desta proteína, fenômeno o qual possibilita a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo (FIGURA 14) (Baldwin, 1996).

Dentre os estímulos que levam à ativação do fator nuclear- $\kappa$ B, podemos citar neurotransmissores como o glutamato, citocinas pró-inflamatórias, produtos provenientes de vírus e bactérias, reações enzimáticas relacionadas a NOS e, também, espécies reativas de oxigênio (Glezera *et al.*, 2000).

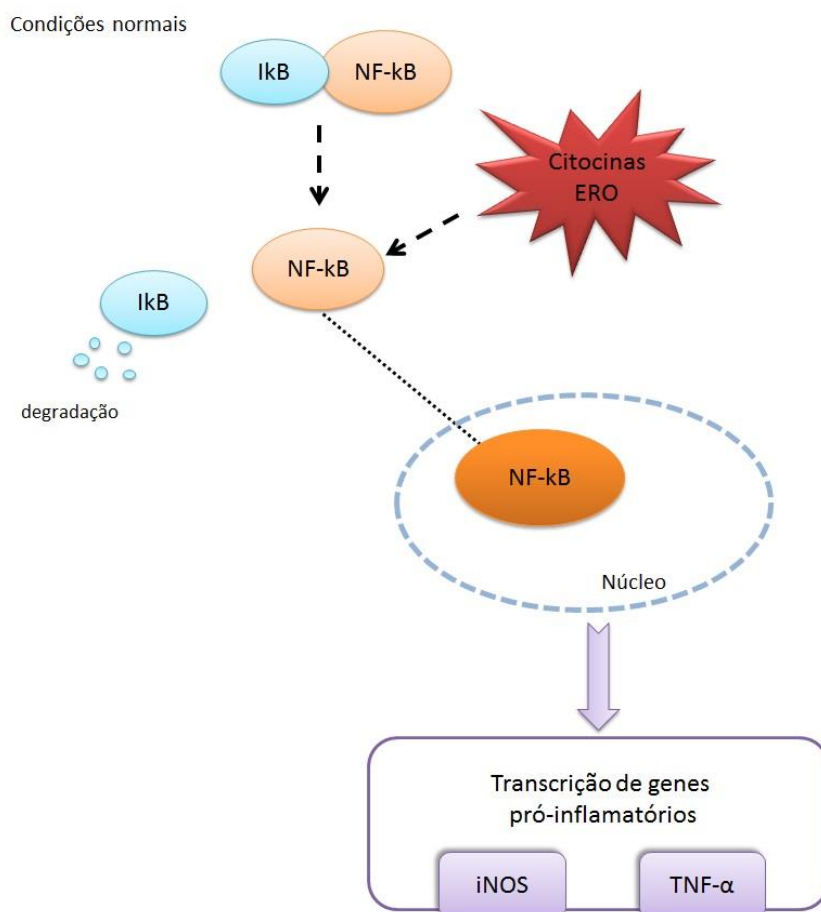


FIGURA 14: Ativação e ação do NF- $\kappa$ B.  
FONTE: Adaptado de Halliwell, 2007.

### 1.5.1.1 Fator nuclear- $\kappa\beta$ na Gastropatia da Hipertensão Portal

A íntima relação do processo inflamatório e a gastropatia da hipertensão já foram apontados por McCormack *et al.* (1985) em um estudo que demonstrou a frequente presença de inflamação no estômago de pacientes com lesões gástricas devido à hipertensão portal. De fato, o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica prejudica os mecanismos de defesa gástricos, causando uma liberação de mediadores pró-inflamatórios, aumentando a vulnerabilidade do tecido e prejudicando a sua regeneração (Gjeorgjievski e Cappell, 2016).

A forma induzível das óxido nítrico sintases (iNOS) está super-expressa neste quadro clínico, sendo ativada ao longo da progressão da doença (Mehta *et al.*, 2014). Essa enzima exerce um importante papel em situações fisiológicas, como o reparo tecidual e defesa imunológica; porém, em situações como infecções e inflamação, apresenta-se aumentada. Esta isoforma é regulada potencialmente pelo fator nuclear- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), e este fator já foi previamente relacionado com o desenvolvimento da inflamação no estômago de pacientes com hipertensão portal (Moreira *et al.*, 2004).

O estímulo para a expressão da iNOS ocorre juntamente com a ativação do sistema imune inato e adaptativo, a infiltração de leucócitos polimorfonucleares e o recrutamento linfocitário. Os últimos, por sua vez, produzem grandes quantidades de óxido nítrico e citocinas como o TNF- $\alpha$ , colaborando, assim, para o estabelecimento do processo inflamatório na gastropatia (Lopez-Talavera *et al.*, 1995).

### 1.5.1.2 Fator nuclear- $\kappa\text{B}$ na Colopatia da Hipertensão Portal

O intestino é considerado um importante local de liberação de citocinas, não apenas durante o estabelecimento de doenças como a hipertensão portal, mas também em situações fisiológicas. Este órgão é um local de intensa proliferação bacteriana, bem como de reserva de produtos provenientes destas bactérias, como lipopolissacarídeos e endotoxinas (Licks *et al.*, 2016). Assim, a

indução de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de liberação de NO durante uma situação de estresse é facilmente correlacionável.

Na colopatia da hipertensão portal, o aumento de pressão na circulação esplâncnica possivelmente dispara a resposta inflamatória intestinal, mediante ao dano tecidual por ela causado. Essa resposta, devido à intensidade do dano tecidual, requer ativação do Fator nuclear- $\kappa$ B, com subsequente liberação de quimiocinas e citocinas, determinando um quadro de inflamação intestinal (Aller *et al.*, 2005).

Ademais, o quadro inflamatório intestinal presente na Hipertensão Portal é considerado um fator agravante na patogênese da doença, e a infiltração leucocitária e processo inflamatório já foram apontados na fisiopatologia da Colopatia da HP (Aller *et al.*, 2013).

#### 1.5.2 Fator de Necrose Tumoral

O Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é um fator sintetizado principalmente por macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e *Natural Killers*, após seu estímulo. Sua principal atividade biológica é, de fato, sua ação antitumoral, caracterizada por uma acentuada citólise e citoestase em diferentes linhagens neoplásicas (Varella e Forte, 2001).

O fator de necrose tumoral é uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes. Após sua produção e liberação, o TNF- $\alpha$  liga-se a receptores específicos encontrados em diferentes células para produzir seu efeito biológico de promoção da resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento e ativação de neutrófilos e monócitos. Ainda, o TNF- $\alpha$  possui uma importante ação de vasodilatação em células endoteliais (Mayeri *et al.*, 2010) e citocinas inflamatórias, já que este fator parece influenciar na produção de óxido nítrico via eNOS (Martell *et al.*, 2010).

O TNF- $\alpha$  também possui um importante papel na ativação do NF- $\kappa$ B, que participa de um amplo espectro de atividades biológicas. O fator de necrose

tumoral causa a fosforilação do I $\kappa$ B, possibilitando a translocação do Fator nuclear- $\kappa$ B e posterior ação inflamatória, apoptótica e nos processos de diferenciação celular (Glezera *et al.*, 2000).

#### 1.5.2.1 Fator de Necrose Tumoral na Gastropatia da Hipertensão Portal

A ativação do fator de necrose tumoral parece contribuir diretamente para o desenvolvimento da circulação colateral e estabelecimento da gastropatia na Hipertensão Portal (Gjeorgjievski e Cappell, 2016). Ainda, o fator de necrose é contribuinte para o agravamento da HP por aumentar o estresse oxidativo intracecular (Werawatganon *et al.*, 2014).

Esta afirmação é estabelecida mediante o fato que o TNF- $\alpha$  contribui para a circulação hiperdinâmica via NO e prostaciclina, sendo esse relacionado com a ativação da iNOS (Kaviani *et al.*, 1997). O TNF- $\alpha$  ainda estimula a translocação do Fator nuclear- $\kappa$ B para o núcleo celular, onde, por sua vez, estimula o aumento da expressão da iNOS (Glezera *et al.*, 2000).

Não só a iNOS, mas também a eNOS já foi previamente relacionada com a vasodilatação no território gástrico (Licks *et al.*, 2015). Em estágios avançados da hipertensão portal, a ativação da eNOS ocorre por diferentes estímulos como *shear stress*, VEGF, HSP-90 e citocinas inflamatórias (Marques *et al.*, 2013). Da mesma forma, a translocação bacteriana ativa a eNOS através da estimulação do TNF- $\alpha$  (Martell *et al.*, 2010).

Assim, existe de fato uma importante contribuição desta citocina pró-inflamatória com o desenvolvimento da gastropatia da hipertensão portal.

#### 1.5.2.2 Fator de necrose tumoral na Colopatia da Hipertensão Portal

Níveis elevados de TNF- $\alpha$  estão presentes no soro de animais com hipertensão portal, sendo esse fator considerado importante para o desenvolvimento da circulação hiperdinâmica (Lopez-Talavera *et al.*, 1995).

A iNOS, enzima sintetizada em macrófagos, células musculares lisas e hepatócitos após indução por lipopolissacarídeos (via translocação bacteriana) e citocinas inflamatórias (liberadas após estresse tecidual), é a isoforma correlacionada com o aumento do fluxo sanguíneo intestinal na CHP, apresentando-se expressa na vasculatura mesentérica durante este quadro, colaborando para o estabelecimento dos processos inflamatórios (Aller *et al.*, 2005).

Dessa forma, a vasodilatação no intestino, decorrente da circulação colateral, e posterior lesão do epitélio intestinal, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, que irão contribuir também para a super-produção de NO, estabelecendo o quadro hemodinâmico e inflamatório presente na Colopatia (Licks *et al.*, 2016).

## 1.6 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

As proteínas de choque térmico (HSPs) são uma família de proteínas altamente conservadas, que executam uma série de funções de “chaperonas”, como o remodelamento de polipeptídeos recém sintetizados e a proteção celular contra agentes agressores (Zuo *et al.*, 2016).

Essas proteínas são classificadas em diferentes subfamílias, de acordo com seu peso molecular. Em mamíferos, quatro destas se destacam (HSP90, HSP70, HSP60 e pequenas HSPs), sendo que algumas destas se apresentam mais expressas em resposta a dano e/ou proteção contra processos apoptóticos e morte celular, e outras são expressas constitutivamente em diferentes compartimentos celulares e são importantes na manutenção da função celular e prevenção de agregação, bem como para o remodelamento de proteínas intracelulares estruturalmente comprometidas (Zuo *et al.*, 2016).

Em termos gerais, as HSPs inicialmente foram caracterizadas por serem induzidas após estresse térmico (*Heat shock*). No entanto, atualmente, estas proteínas são associadas à resposta celular a determinados eventos estressores, como as espécies reativas de oxigênio, a isquemia e reperfusão, e o processo



inflamatório. Dessa forma, as HSPs já foram associadas à fisiopatologia de diferentes doenças, inclusive do trato gastro-intestinal (Dudeja *et al.*, 2009).

Dentre as HSPs, a HSP90 é responsável pela estabilização e ativação de cerca de 200 proteínas em células de mamíferos, desempenhando um papel essencial na homeostase celular, regulação transcricional, remodelamento da cromatina e reparo de DNA. Esta proteína representa de 1-2% do conteúdo celular proteico total, sendo considerada indispensável para a manutenção da célula contra qualquer estresse ambiental (FIGURA 15) (Pennisi *et al.*, 2015).

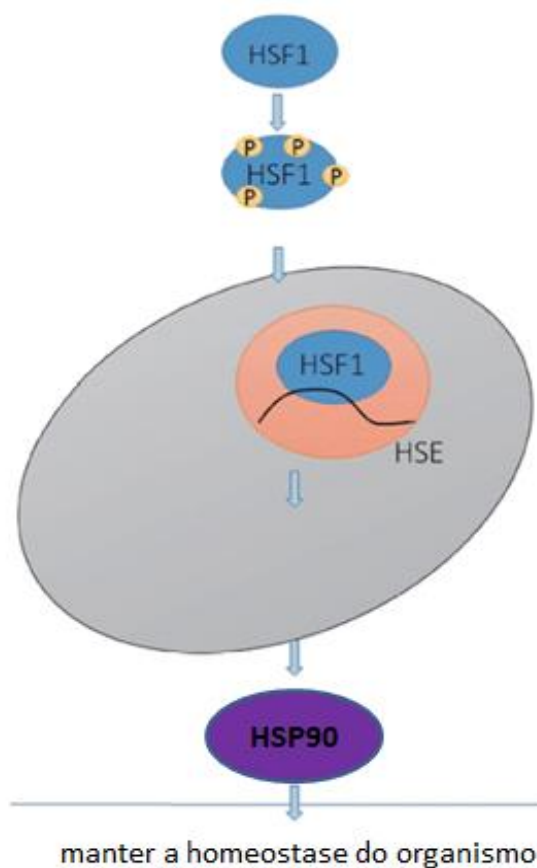


FIGURA 15: HSP90  
FONTE: Adaptado de Jee, 2016.

### 1.6.1 HSP90 na Gastropatia da Hipertensão Portal

O estabelecimento do quadro de gastropatia é determinado pela super-produção de óxido nítrico que, por sua vez, contribui para o desenvolvimento da circulação hemodinâmica (Bosch *et al.*, 2015).

A interação da eNOS com a HSP90 facilita a produção de NO em resposta à estímulos mecânicos como o *shear-stress* e fatores de crescimento como o VEGF, através da via de sinalização da proteína G. Por sua vez, a regulação do tônus vascular na circulação mesentérica contribui para a regulação da pressão portal, agravando o quadro geral e estabelecendo a gastropatia (Shah *et al.*, 1999).

Dessa forma, a ativação da eNOS através dos receptores acoplados à proteína G é facilitada pela sinalização da HSP90 (Garcia-Cardena *et al.*, 1998), sugerindo que a ativação da NOS na vasculatura mesentérica pode ser associada à produção de HSP90, sinalizada pelo estresse vascular presente na gastropatia da hipertensão portal.

## 1.7 DANOS AO DNA

Dentre as muitas consequências do estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo, o dano ao DNA é associado diretamente com a ação das espécies reativas de oxigênio (Grindel *et al.*, 2016).

Essas espécies podem reagir com diferentes estruturas orgânicas, como proteínas, lipídeos, enzimas e ácidos nucleicos, gerando importantes alterações e disfunção celular. No DNA, os danos são caracterizados predominantemente pela quebra de uma cadeia e/ou modificações de bases, causados pela reação dos radicais com as bases de DNA (Soares *et al.*, 2015).

Dados na literatura apontam algumas metodologias capazes de mensurar o dano ao DNA em diferentes modelos experimentais, podendo assim associá-lo ao estresse oxidativo. O ensaio cometa é um método simples e sensível que mensura quantitativamente o dano ao DNA em células individuais, as quais são submetidas a uma corrente elétrica que proporciona a migração dos segmentos de DNA livres, ou seja, resultantes de quebra, para fora do núcleo. Essa migração pode ser detectada visualmente por uma cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Dessa forma, podemos mensurar o nível de dano ao DNA no analito em questão (Fairbairn *et al.*, 1995).

Nosso grupo de pesquisa já utilizou este método para avaliar o dano ao DNA em modelos experimentais relacionados ao estresse oxidativo, tal como o modelo animal de esteatohepatite não alcoólica (Marcolin *et al.*, 2013).

#### 1.7.1 Danos ao DNA na Hipertensão Portal

O fato de que a hipertensão portal é doença relacionada ao estresse oxidativo é muito bem estabelecido na literatura (Gjeorgjievski e Cappell, 2016). Ademais, uma vez que o EO gera danos ao DNA, supõe-se que em um modelo experimental de hipertensão portal podemos encontrar danos ao DNA em um analito, por exemplo, como o sangue.

No entanto, dados na literatura são escassos utilizando esta metodologia em modelo animal de hipertensão portal.

#### 1.8 N-ACETILCISTEÍNA

A N-acetilcisteína (NAC) é um composto tiólico amplamente utilizado na clínica médica, que contém um grupo sulfidril formado pela seguinte fórmula química  $C_5H_9NO_3S$  (FIGURA 16) (Ziment, 1988). A NAC entra na célula e no citoplasma é convertida a L-cisteína, promovendo a sua ação antioxidante (Faintuch *et al.*, 1999).

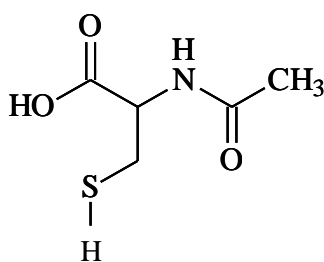


FIGURA 16: Fórmula química da N-acetilcisteína (NAC).  
FONTE: Adaptado de Ziment, 1988.

Os antioxidantes são moléculas conhecidas amplamente, naturais ou sintéticas, adquiridos via dieta ou produção endógena, cuja função principal é combater o estresse oxidativo. Dentre esses, a glutatona (GSH) é considerada o

mais abundante antioxidante tiol, cuja proteção é versátil, agindo contra danos oxidativos e toxicidade celular (Chen *et al.*, 2013).

A NAC 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 (Nagareddy *et al.*, 2006).

A ação da NAC na restauração dos níveis de GSH já é estabelecida, visto que a glutathione neutraliza espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através de vias diretas e indiretas (FIGURA 17) (Vercelino *et al.*, 2008). 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 (Dean *et al.*, 2011).

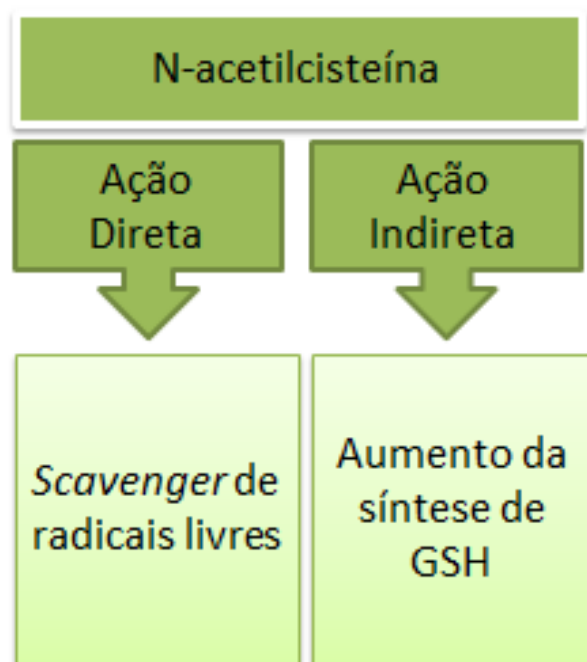


FIGURA 17: Ações da N-acetilcisteína (NAC).  
FONTE: Adaptado de Vercelino *et al.*, 2008.

Ainda, a NAC apresenta um ótimo estado redox, que é de extrema importância na proteção celular contra o estresse oxidativo e processo

inflamatório, sendo descrita previamente como uma alternativa promissora no tratamento de doenças hepáticas (De Andrade *et al.*, 2015).

#### 1.8.1 NAC na Gastropatia da Hipertensão Portal

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 promissor em inúmeras doenças relacionadas a tais quadros, assim como a gastropatia da hipertensão portal.

Moléculas antioxidantes como a NAC demonstraram ser eficazes em melhorar a resistência hepática e hipertensão portal estabelecida em um quadro de cirrose (Yang *et al.*, 2008). Na hipertensão portal propriamente dita, a NAC já foi utilizada na prevenção do desenvolvimento da circulação colateral em modelo animal de HP (Fernando *et al.*, 1998).

Tendo em vista que a gastropatia é um quadro estabelecido em virtude do desenvolvimento da circulação colateral hiperdinâmica, o tratamento com este potente antioxidante pode ser uma alternativa plausível para determinar a regressão e/ou melhora do quadro clínico geral do paciente. Ademais, a NAC atua na modulação do óxido nítrico através da interação do seu componente tiol com o NO formando nitrotiol, possivelmente minimizando a dilatação vascular presente na mucosa gástrica em um quadro de gastropatia (Zhuang *et al.*, 2012).

Ainda, a NAC é conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias. Possuindo atividade moduladora em diferentes etapas do processo inflamatório e fagocítico, estimula as funções imunológicas e reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Andrade *et al.*, 2015). Sendo a inflamação um fator agravante da gastropatia, sugere-se a ação antiinflamatória da NAC como uma importante contribuição para a melhoria da doença.

### 1.8.2 NAC na Colopatia da Hipertensão Portal.

O quadro de colopatia da hipertensão portal é estabelecido mediante a dilatação vascular na submucosa colo-retal, sendo considerada semelhante ao estabelecimento dessa desordem vascular no trato gastro-intestinal superior (Urrunaga e Rockey, 2014). Dessa forma, a colopatia é considerada, da mesma forma, uma doença associada ao estresse oxidativo e processo inflamatório.

A administração de NAC em condições inflamatórias intestinais foi classificada como benéfica em estudo anterior (Moura *et al.*, 2015), sendo sua ação anti-inflamatória muito significativa. Ainda, a ação antioxidante da NAC em doenças inflamatórias intestinais relacionadas ao estresse oxidativo já foi previamente descrita (Zabot *et al.*, 2014).

Assim, a ação sinérgica anti-inflamatória e antioxidante da NAC pode, também, contribuir para a redução dos danos acarretados pela colopatia da hipertensão portal.

Tendo em vista estas considerações, objetivou-se desenvolver um modelo de hipertensão portal com o intuito de estudar as alterações na gastropatia e colopatia, avaliando o envolvimento do estresse oxidativo, do óxido nítrico e marcadores antioxidantes, anti-inflamatórios e danos ao DNA neste modelo experimental, bem como a ação da N-acetilcisteína sob todos os parâmetros acima citados.

## 2 OBJETIVOS DO ESTUDO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo geral avaliar o efeito da N-acetilcisteína no estômago e intestino grosso de ratos com ligadura parcial de veia porta, um modelo experimental de Hipertensão Portal (HP) em ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.2.1 Experimento I

Respondidos no artigo I: *Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats*, publicado na revista *Annals of Hepatology*

1. Mensurar a pressão portal através da veia mesentérica nos diferentes grupos experimentais;
2. Avaliar os níveis séricos das aminotransferases aspartato (AST) e alanina (ALT) e da fosfatase alcalina (FA) nos diferentes grupos experimentais;
3. Avaliar a lipoperoxidação utilizando o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;
4. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutaciona 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.

### 2.2.2 Experimento II

Respondidos no artigo II: *N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats*, publicado na revista *World Journal of Gastroenterology*

1. Avaliar a imunorreatividade das proteínas eNOS, VEGF e Nitrotirosina (NTT) pelo método de imunohistoquímica no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;
2. Avaliar a expressão das proteínas eNOS e VEGF pela técnica de *Western blot* no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;
3. Avaliar o dano ao DNA através do ensaio cometa no sangue dos animais dos diferentes grupos experimentais.

### 2.2.3 Experimento III

Respondidos no artigo III: *Synergistic antioxidant and anti-inflammatory action of N-acetylcysteine in portal hypertensive gastropathy in rat*, submetido na revista *Plos One*.

1. Avaliar a imunorreatividade das proteínas NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  pelo método de imunohistoquímica no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;



2. Avaliar a expressão das proteínas HSP90, NQO1, iNOS e SOD pela técnica de *Western blot* no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais.

#### 2.2.4 Experimento IV

Respondidos no artigo IV: *Inflammatory bowel and oxidative stress changes in an experimental model of portal hypertension: action of N-acetylcysteine*, publicado na revista *Journal of Coloproctology*.

1. Avaliar a lipoperoxidação utilizando o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no intestino grosso dos animais dos diferentes grupos experimentais;

2. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no intestino dos animais dos diferentes grupos experimentais;

3. Avaliar a imunorreatividade das proteínas NF-kB e TNF- $\alpha$  pelo método de imunohistoquímica no intestino dos animais dos diferentes grupos experimentais;

4. Avaliar a expressão da proteína iNOS pela técnica de *Western blot* no intestino dos animais dos diferentes grupos experimentais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 EXPERIMENTO I

##### 3.1.1 Delineamento do Estudo

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo, sendo realizada a indução da hipertensão portal por meio do modelo experimental de ligadura parcial de veia porta (LPVP), bem como a simulação do modelo em animais do grupo controle (SO).

##### 3.1.2 Delineamento Experimental

###### 3.1.2.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar (n=6), com peso médio de 250 g, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, RS. Durante o experimento, os animais foram mantidos no biotério da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), em caixas plásticas de 47x34x18 cm, forradas com maravalha, em ciclos de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Água e a ração da marca Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil), foram oferecidas *ad libitum*, diariamente .

###### 3.1.2.2 Considerações Bioéticas

Todos os procedimentos realizados seguiram de acordo com as normas estabelecidas pela “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, preparada pela “National Academy of Sciences (NIH). O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ULBRA.

### 3.1.2.3 Grupos Experimentais

Para detectar uma diferença na magnitude de 1,5 desvio padrão (magnitude de efeito grande) mantendo-se um  $\alpha=0,05$  e  $\beta=90\%$ , foram calculados seis ratos por grupo ( $n=6$ ), totalizando 24 ratos. O modelo utilizado para a indução da hipertensão portal foi a ligadura parcial de veia porta (LPVP), e os animais divididos em quatro grupos experimentais.

- 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 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.

### 3.1.2.4 Procedimentos Experimentais

#### 3.1.2.4.1 Desenvolvimento do Modelo de Hipertensão Portal

Os animais foram anestesiados com cetamina 100 mg/Kg e xilazina 50 mg/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 20 G foi colocada sobre a veia porta e ambas amarradas em fio de seda 3.0. Após, a agulha foi retirada delicadamente, deixando o vaso parcialmente obstruído, sendo necessária a certificação da não ocorrência de trombose da veia porta durante sua manipulação (FIGURA 18) (Sikuler *et al.*,1985).

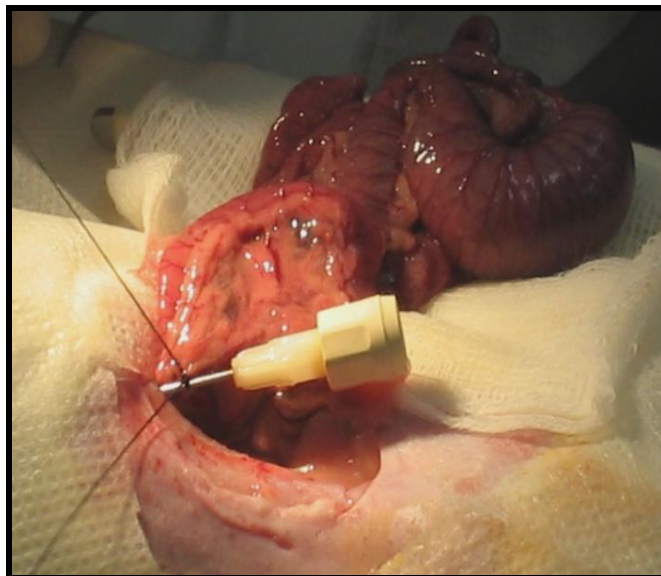


FIGURA 18: Ligadura parcial da veia porta (LPVP).  
FONTE: Autor.

As alças intestinais foram colocadas no abdome e, com pontos contínuos, fechou-se o peritônio, infundindo-se anteriormente cerca de 10 mL de solução fisiológica na cavidade abdominal. O peritônio foi suturado utilizando um fio vicryl 4.0 e a parede exterior com pontos isolados utilizando fio mono 4.0. Uma solução antiséptica foi aplicada e os animais mantidos em incubadora até plena recuperação pós-cirúrgica, antes de serem direcionados para sua respectiva gaiola. Após os animais recuperarem-se da anestesia em caixas individuais, forradas com maravalha e em incubadoras para recém-nascidos (aquecimento e suporte de oxigênio), foram analgesiados no pós-operatório com dipirona (200 mg/Kg), sendo a primeira administração intramuscular e as posteriores por via-oral (6 gotas) (500 mg/kg), com frequência de 8/8 horas por 72h.

Os animais controles ou operados ficticiamente (SO) sofreram o mesmo procedimento, não tendo, no entanto, a veia porta parcialmente ligada. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, devidamente supervisionados até o dia do experimento.

#### 3.1.2.4.2 Administração do Veículo e da N-acetilcisteína

O tratamento diário com a NAC iniciou-se a partir do 8º dia do procedimento cirúrgico por via intraperitoneal, na dose de 10 mg de N-acetilcisteína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA: CAS registry number 616-91-1) por Kg de peso do animal (Vercelino *et al.*, 2008), diluída em 0,6 mL de veículo. Os animais controle receberam somente o veículo (solução fisiológica-NaCl 0,9%) no mesmo volume.

#### 3.1.2.4.3 Obtenção das Amostras de Tecido, Sangue e Morte dos Animais

Transcorridos quinze dias do desenvolvimento do modelo experimental e tratamento, os animais foram novamente pesados e anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilasina (50 mg/kg) por via intraperitoneal. Posteriormente, realizou-se tricotomia da região abdominal, seguida de uma laparotomia ventral média, para que as alças intestinais fossem expostas. Primeiramente, foi aferida a pressão portal dos animais. Após, coletado sangue pela técnica da punção do plexo retro-orbital e retirados os estômagos para as posteriores análises, da seguinte forma:

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

2º) O restante do estômago foi pesado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises de lipoperoxidação, enzimas antioxidantes e avaliação de nitritos e nitratos.

Ao final do experimento, os animais sofreram eutanásia por exanguinação sob anestesia profunda, conforme descrito em *AVMA Guidelines from Euthanasia* (AVMA, 2007).

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

#### 3.1.2.4.4 Análises Laboratoriais

##### 3.1.2.4.4.1 Aferição da Pressão Portal

A aferição da pressão portal foi realizada através de um cateter inserido na veia mesentérica, após laparotomia ventral média e exposição das alças intestinais. O cateter foi conectado a um polígrafo de registro Lettica (Rochester, MI, USA) que aferiu a pressão na veia mesentérica, expressando o valor em mmHg (FIGURA 19).

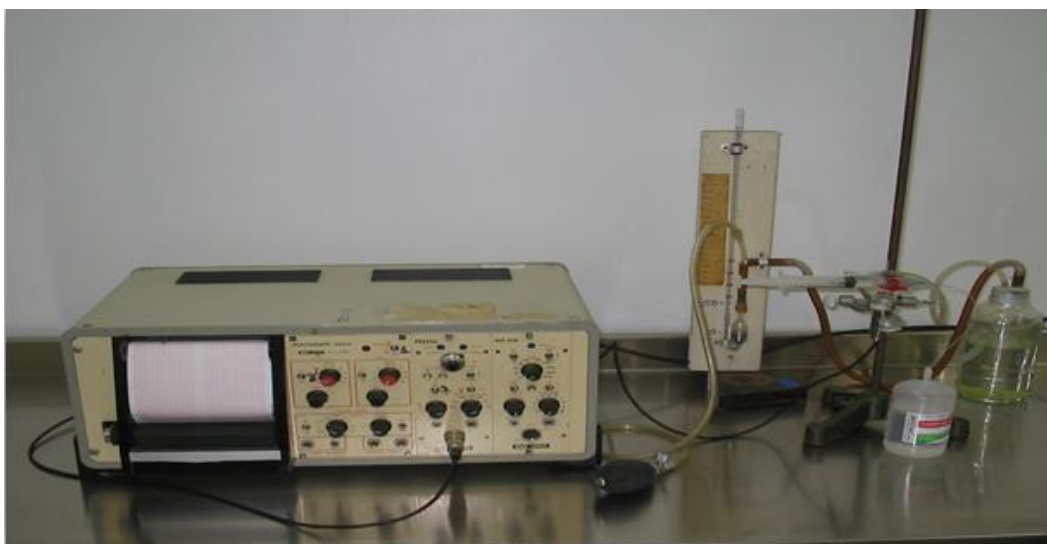


FIGURA 19: Polígrafo de pressão Lettica (Rochester, MI, USA)  
FONTE: Autor.

#### 3.1.2.4.4.2 *Determinação das Enzimas Aspartato-aminotransferase, Alanina-aminotransferase e Fosfatase Alcalina*

Através de um capilar heparinizado, uma amostra de sangue foi coletada através do método de punção do plexo retro-orbital, e este material foi utilizado para realizar as provas de integridade hepática por meio das análises das enzimas aspartato-aminotransferase (AST), da alanina-aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FA).

O sangue foi devidamente acondicionado e destinado para a Central de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde os níveis séricos foram mensurados através método enzimático automatizado (sistema Siemens Advia 1800) e expressos em U/L.

#### 3.1.2.4.4.3 *Preparo do Homogeneizado*

Os estômagos foram retirados, pesados e armazenados em freezer -80°C. Foram adicionados 5 ml de buffer fosfato (140 mM KCl, 20 mM fosfato, pH 7.4) por grama de tecido, e homogeneizados durante 40 segundos em Ultra-Turrax (IKA-WERK) na temperatura de 4°C. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 4000 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 (Llesuy *et al.*, 1985).

#### 3.1.2.4.4.4 *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 (Bradford, 1976).

#### 3.1.2.4.4.5 *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 (TBARS). A técnica de TBARS 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 535 nm. 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) 0,37%, 0,25 mL de água destilada, 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 15% e 0,25 mL 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 30 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 (612.8 x g) a 4°C. Por último, o produto foi retirado e a leitura em espectrofotômetro realizada (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBARS foi expressa em nmoles/mg de proteína (Buege e Aust, 1978).

#### 3.1.2.4.4.6 *Determinação dos Metabólitos do Óxido Nítrico (nitritos e 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 é feita de forma indireta, através da medida de nitritos e nitratos. Esse método consiste na redução enzimática de nitratos a nitritos na presença de nitrato redutase e NADPH, e posterior reação dos nitritos formados (ou presentes inicialmente nas amostras) com o reagente de Griess (mistura de sulfanilamida e naftiletilenodiamina, específico para  $\text{NO}_2^-$ ). A leitura foi realizada em leitor de

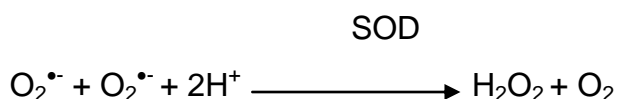


microplacas a 540 nm e os resultados expressos em mmol de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> (Granger *et al.*,1999).

#### 3.1.2.4.4.7 Determinação da 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<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

A reação catalisada é a seguinte:



A atividade da enzima antioxidante SOD avalia a capacidade dessa enzima em inibir a reação do radical superóxido com epinefrina. Em uma micoplaca de 96 poços, foi colocada tampão glicina (50 mM pH 11), homogeneizado e a epinefrina (60 mM pH 2). Após foi feita agitação e a leitura realizada a 480 nm. Os dados são expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína (USOD/mg prot) (Misra e Fridovich, 1972).

#### 3.1.2.4.4.8 Determinação da Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase

A enzima GPx atua sobre o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizando a GSH como doador de hidrogênios. A técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo a velocidade de oxidação do NADPH na presença de glutathione reduzida e de glutathione redutase em uma reação. Para tal, em uma cubeta de quartzo foram colocados solução reguladora de fosfatos potássios (100 mM, pH 7,0), glutathione reduzida (GSH) (40 mM), glutathione redutase (GR), NADPH (10 mM) e azida sódica (20mM) para a inibição da atividade da catalase. As amostras foram lidas numa absorvância de 340 nm e a atividade foi expressa em nmol/min/mg de proteína (Flohe *et al.*,1973).

#### 3.1.2.4.5 Análises Histológicas

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.

Inicialmente o estômago foi dissecado e incluso em blocos de parafina, fixados ao Micrótomo (Leitz<sup>®</sup>1512), onde se realizaram cortes com 3 micra (3  $\mu$ ). 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*.

#### 3.1.2.4.6 Biossegurança e Descarte de Resíduos

Os frascos, luvas e demais materiais contaminados foram devidamente descartados nos lixos de materiais específicos da ULBRA, para posterior incineração. Os resíduos provenientes dos reagentes utilizados nas técnicas foram devidamente armazenados em frascos específicos e destinados ao Setor de Higienização responsável pelo procedimento correto de eliminação. Os demais resíduos não tóxicos foram descartados no sistema de esgoto comum.

#### 3.1.2.4.7 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) seguida de teste *Student-Newman-Keuls* para múltiplas comparações, sendo o nível de significância adotado de 5% ( $P < 0,05$ ).

### 3.2 EXPERIMENTO II

#### 3.2.1 Delineamento do Estudo

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo, sendo realizada a indução da hipertensão portal por meio do modelo experimental de ligadura parcial de veia porta (LPVP), bem como a simulação do modelo em animais do grupo controle (SO).

#### 3.2.2 Delineamento Experimental

##### 3.2.2.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar ( $n=6$ ), com peso médio de 250 g, provenientes do biotério do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS. Durante o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas de 47x34x18 cm, forradas com maravalha, em ciclos de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Água e a ração da marca Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil) foram oferecidas *ad libitum* diariamente.

##### 3.2.2.2 Considerações Bioéticas

Todos os procedimentos realizados seguiram de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-

Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) bem como o preconizado no Principles for Research Involving Animals (NAS) (Goldim e Raymundo,1997).

### 3.2.2.3 Grupos Experimentais

Para detectar uma diferença na magnitude de 1,5 desvio padrão (magnitude de efeito grande) mantendo-se um  $\alpha=0,05$  e  $\beta=90\%$ , foram calculados seis ratos por grupo ( $n=6$ ), totalizando 24 ratos. O modelo utilizado para a indução da hipertensão portal foi a ligadura parcial de veia porta (LPVP), e os animais divididos em quatro grupos experimentais.

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 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.

### 3.2.2.4 Procedimentos Experimentais

#### 3.2.2.4.1 Desenvolvimento do Modelo de Hipertensão Portal

Os animais foram anestesiados com cetamina 100 mg/Kg e xilazina 50 mg/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 20 G foi colocada sobre a veia porta e ambas amarradas em fio de seda 3.0. Após, a agulha foi retirada delicadamente, deixando o vaso parcialmente obstruído, sendo necessária a certificação da não ocorrência de trombose da veia porta durante sua manipulação (Sikuler *et al.*, 1985).

As alças intestinais foram colocadas no abdome e, com pontos contínuos, fechou-se o peritônio, infundindo-se anteriormente cerca de 10 mL de solução fisiológica na cavidade abdominal. O peritônio foi suturado utilizando um fio *vicryl* 4.0 e a parede exterior com pontos isolados utilizando fio mono 4.0. Uma solução antiséptica foi aplicada e os animais mantidos em incubadora até plena recuperação pós-cirúrgica, antes de serem direcionados para sua respectiva gaiola. Após os animais recuperarem-se da anestesia em caixas individuais, forradas com maravalha e em incubadoras para recém-nascidos (aquecimento e suporte de oxigênio), foram analgesiados no pós-operatório com dipirona (200 mg/Kg), sendo a primeira administração intramuscular e as posteriores por via-oral (6 gotas) (500 mg/kg), com frequência de 8/8 horas por 72h.

Os animais controles ou operados ficticiamente (SO) sofreram o mesmo procedimento, não tendo, no entanto, a veia porta parcialmente ligada. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, devidamente supervisionados até o dia do experimento.

#### 3.2.2.4.2 Administração do Veículo e da N-acetilcisteína

O tratamento diário com a NAC iniciou-se a partir do 8º dia do procedimento cirúrgico por via intraperitoneal, na dose de 10 mg de N-

acetilcisteína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA: CAS registry number 616-91-1) por Kg de peso do animal (Vercelino *et al.*, 2008), diluída em 0,6 mL de veículo. Os animais controle receberam somente o veículo (solução fisiológica-NaCl 0,9%) no mesmo volume.

#### 3.2.2.4.3 Obtenção das Amostras de Tecido, Sangue e Morte dos Animais

Transcorridos quinze dias do desenvolvimento do modelo experimental e tratamento, 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. Posteriormente, realizou-se tricotomia da região abdominal, seguida de uma laparotomia ventral média, para que as alças intestinais fossem expostas. Primeiramente, foi aferida a pressão portal dos animais. Após, coletado sangue pela técnica da punção do plexo retro-orbital e retirados os estômagos para as posteriores análises, da seguinte forma:

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

2º) O restante do estômago foi pesado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises de *Western blot*.

Ao final do experimento, os animais sofreram eutanásia por exanguinação sob anestesia profunda, conforme descrito em *AVMA Guidelines from Euthanasia* (AVMA, 2007).

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

#### 3.2.2.4.4 Análises Laboratoriais

##### 3.2.2.4.4.1 Aferição da Pressão Portal

A aferição da pressão portal foi realizada através de um cateter inserido na veia mesentérica, após laparotomia ventral média e exposição das alças intestinais. O cateter foi conectado a um polígrafo de registro Lettica (Rochester, MI, USA) que aferiu a pressão na veia mesentérica, expressando o valor em mmHg.

##### 3.2.2.4.4.2 Avaliação da Expressão das Proteínas eNOS, VEGF e Nitrotirosina pela Técnica de Imunohistoquímica

A expressão das proteínas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e Nitrotirosina (NTT) foram determinadas através de análise imunohistoquímica. A recuperação antigênica foi estabelecida usando um tampão a 100°C e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com metanol absoluto. As lâminas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho (NOS3 C-20 (sc-654), 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo monoclonal de rato (VEGF C-1 (sc-7269), 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo policlonal de coelho (Nitro-Tyrosine Antibody (#9691), 1:200, Cell Signaling Technology), “*overnight*” a uma temperatura de 4°C As lâminas foram lavadas com tampão e incubadas com o anticorpo secundário para eNOS (goat anti-rabbit IgG-HRP 2004), para VEGF (goat anti-mouse IgG-HRP 2005) e para NTT (anti-rabbit IgG-HRP 7074) durante 30 minutos em temperatura ambiente. O material foi analisado por um patologista sem conhecimento prévio dos grupos do trabalho, utilizando um microscópio equipado com uma câmera digital para capturar imagens usando o programa Image-Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

A quantificação da expressão da eNOS, VEGF e NTT foi realizada via análise digital com Adobe Photoshop® CS3 extended10.0, e envolveu a contagem dos pixels corados por análise imunohistoquímica. O nível da sua expressão foi determinado pela multiplicação da densidade média da imagem

pela porcentagem de áreas positivamente coradas (áreas de coloração castanha) (Gaffey *et al.*, 1992).

#### 3.2.2.4.4.3 Avaliação da Expressão das Proteínas eNOS e VEGF pela Técnica de Western blot

A análise de *Western blot* foi feita em extrato citosólico preparado a partir do homogeneizado de estômago. A fracção sobrenadante foi recolhida e armazenada a 80°C em alíquotas até a sua utilização. A concentração de proteína foi medida por Bradford (1976). As proteínas lisadas foram fraccionadas por electroforese em gel de sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). As membranas foram então bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado em solução salina Trisbuffered contendo 0,05% de Tween 20 (TTBS) durante 1 hora à temperatura ambiente e sondadas durante a noite a 4°C com anticorpo policlonal de coelho (NOS3 C-20 (sc-654), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo monoclonal de rato (VEGF C-1 (sc-7269), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), em uma diluição de 1:200-1.000 com TTBS em 5% de leite em pó desnatado, e anticorpo anti- $\beta$ -actina (42 kDA) (Sigma Aldrich, StLouis, MO, USA) em uma diluição de 1: com TTBS em 5% de leite em pó desnatado. Após lavagem com TTBS, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado com HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1: 4,000). A detecção de proteínas foi realizada através de quimioluminescência utilizando um kit ECL comercial (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Grã-Bretanha). A densidade das bandas específicas foi quantificada com um densitômetro de imagem Software (Scion Image, Maryland, MA) (Tuñon *et al.*, 2013).

#### 3.2.2.4.4.4 Avaliação dos Danos ao DNA Através do Ensaio Cometa

O ensaio do cometa alcalino foi realizado como descrito em (Speit e Hartmann, 1999), com pequenas modificações (Picada *et al.*, 2003). As amostras de sangue (50  $\mu$ L) foram colocadas em 5  $\mu$ L de anti-coagulante (heparina sódica



25.000 UI-Liquemine®). Suspensões de células sanguíneas (5 µL) foram incorporadas em 95 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,75% (Gilco BRL) e espalhadas em lâminas de microscópio microatadas pré-revestidas com agarose. Após solidificação, as lâminas foram colocadas em tampão de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM, pH 10,0), com Triton X-100 a 1% recentemente adicionado (Sigma) e DMSO a 10% durante 48h a 4°C. As lâminas foram subsequentemente incubadas em tampão alcalino preparado recentemente (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH > 13) durante 20 min, a 4°C. Uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) foi aplicada por 15 min para realizar a eletroforese de DNA. As lâminas foram então neutralizadas (Tris 0,4 M, pH 7,5), coradas com prata e analisadas utilizando microscópio. Foram analisadas imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas replicadas) de cada animal. As células foram também marcadas visualmente de acordo com a dimensão da cauda em cinco classes variando desde não danificadas (0) até danos máximos (4), resultando em uma pontuação de dano de DNA único para cada animal e, conseqüentemente, para cada grupo estudado. Portanto, o índice de danos (DI) pode variar de 0 (completamente não danificado, 100 células × 0) a 400 (com danos máximos, 100 × 4). A frequência de dano (%) foi calculada com base no número de células caudadas versus sem cauda.

#### *3.2.2.4.5 Biossegurança e Descarte de Resíduos*

Os frascos, luvas e demais materiais contaminados foram devidamente descartados nos lixos de materiais específicos do HCPA, para posterior incineração. Os resíduos provenientes dos reagentes utilizados nas técnicas foram devidamente armazenados em frascos específicos e destinados ao Setor de Higienização responsável pelo procedimento correto de eliminação. Os demais resíduos não tóxicos foram descartados no sistema de esgoto comum.

#### 3.2.2.4.6 Análise Estatística

Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  SE. A significância estatística foi calculada usando Graphpad InStat, versão 3.0 para Windows. A análise de variância (ANOVA) e *Student-Newman-Keuls* foram utilizadas para análise múltipla, e o nível de significância foi de 5% ( $P < 0,05$ ). Para o ensaio do cometa, a normalidade das variáveis foi avaliada utilizando o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas utilizando o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* com a correção de *Dunn* para comparações múltiplas para o ensaio de cometas. O teste “t” de *Student* foi utilizado para comparar os danos entre os controles negativo e positivo. O nível crítico para a rejeição da hipótese nula foi considerado um valor de P de 5%.

### 3.3 EXPERIMENTO III

#### 3.3.1 Delineamento do estudo

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo, sendo realizada a indução da hipertensão portal por meio do modelo experimental de ligadura parcial de veia porta (LPVP), bem como a simulação do modelo em animais do grupo controle (SO).

#### 3.3.2 Delineamento experimental

##### 3.3.2.1 Animais

Foram utilizados 18 ratos machos Wistar ( $n=6$ ), com peso médio de 250 g, provenientes do biotério do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS. Durante o experimento, os animais foram mantidos no mesmo local em caixas plásticas de 47x34x18 cm, forradas com maravalha, em ciclos de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Água e a ração da marca Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil) foram oferecidas *ad libitum* diariamente.

### 3.3.2.2 Considerações Bioéticas

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a legislação brasileira vigente para a prática da pesquisa científica com animais (Lei Federal nº 11.794/08) com políticas determinadas na Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, 2013.

### 3.3.2.3 Grupos Experimentais

Para detectar uma diferença na magnitude de 1,5 desvio padrão (magnitude de efeito grande) mantendo-se um  $\alpha=0,05$  e  $\beta=90\%$ , foram calculados seis ratos por grupo ( $n=6$ ), totalizando 18 ratos. O modelo utilizado para a indução da hipertensão portal foi a ligadura parcial de veia porta (LPVP), e os animais divididos em quatro grupos experimentais.

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

### 3.3.2.4 Procedimentos Experimentais

#### 3.3.2.4.1 Desenvolvimento do Modelo de Hipertensão Portal

Os animais foram anestesiados com cetamina 100 mg/Kg e xilazina 10 mg/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 20 G foi colocada sobre a veia porta e ambas amarradas em fio de seda 3.0. Após, a agulha foi retirada delicadamente, deixando o vaso parcialmente obstruído, sendo necessária a certificação da não ocorrência de trombose da veia porta durante sua manipulação (Sikuler *et al.*, 1985).

As alças intestinais foram colocadas no abdome e, com pontos contínuos, fechou-se o peritônio, infundindo-se anteriormente cerca de 10 mL de solução fisiológica na cavidade abdominal. O peritônio foi suturado utilizando um fio vicryl 4.0 e a parede exterior com pontos isolados utilizando fio mono 4.0. Uma solução antiséptica foi aplicada e os animais mantidos em incubadora até plena recuperação pós-cirúrgica, antes de serem direcionados para sua respectiva gaiola. Após os animais recuperarem-se da anestesia em caixas individuais, forradas com maravalha e em incubadoras para recém-nascidos (aquecimento e suporte de oxigênio), foram analgesiados no pós-operatório com dipirona (200 mg/Kg), sendo a primeira administração intramuscular e as posteriores por via oral (6 gotas) (500 mg/kg), com frequência de 8/8 horas por 72h.

Os animais controles ou operados ficticiamente (SO) sofreram o mesmo procedimento, não tendo, no entanto, a veia porta parcialmente ligada. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, devidamente supervisionados até o dia do experimento.

#### 3.3.2.4.2 Administração do Veículo e da N-acetilcisteína

O tratamento diário com a NAC iniciou-se a partir do 8º dia do procedimento cirúrgico por via intraperitoneal, na dose de 10 mg de N-

acetilcisteína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA: CAS registry number 616-91-1) por Kg de peso do animal (Vercelino *et al.*, 2008), diluída em 0,6 mL de veículo. Os animais controle receberam somente o veículo (solução fisiológica-NaCl 0,9%) no mesmo volume.

#### 3.3.2.4.3 Obtenção das Amostras de Tecido, Sangue e Morte dos Animais

Transcorridos quinze dias do desenvolvimento do modelo experimental e tratamento, 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. Posteriormente, realizou-se tricotomia da região abdominal, seguida de uma laparotomia ventral média, para que as alças intestinais fossem expostas. Os estômagos foram retirados para as posteriores análises, da seguinte forma:

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

2º) O restante do estômago foi pesado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises de *Western blot*.

Ao final do experimento, os animais sofreram eutanásia por exanguinação sob anestesia profunda, conforme descrito em *AVMA Guidelines from Euthanasia* (AVMA, 2007).

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

#### 3.3.2.4.4 Análises Laboratoriais

##### 3.3.2.4.4.1 Avaliação da Expressão das Proteínas iNOS, HSP90, NQO1 e SOD pela Técnica de Western blot

A análise de *Western blot* foi feita em extrato citosólico preparado a partir do homogeneizado de estômago. A fracção sobrenadante foi recolhida e armazenada a 80°C em alíquotas até à sua utilização. A concentração de proteína foi medida por Bradford (1976). As proteínas lisadas foram fraccionadas por electroforese em gel de sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). As membranas foram então bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado em solução salina Trisbuffered contendo 0,05% de Tween 20 (TTBS) durante 1 hora à temperatura ambiente e sondadas durante a noite a 4°C com anticorpo policlonal de rato (NOS2 (sc-7271), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo monoclonal de rato (HSP90 (sc-101494), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo monoclonal de cabra (NQO1 (sc-16464), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anticorpo monoclonal de cabra (SOD (sc-8637), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), em uma diluição de 1:200-1.000 com TTBS em 5% de leite em pós desnatado, e anticorpo anti- $\beta$ -actina (42 kDA) (Sigma Aldrich, StLouis, MO, USA) em uma diluição de 1: com TTBS em 5% de leite em pós desnatado. Após lavagem com TTBS, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com anticorpo secundário (goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005, e donkey anti-goat sc-2020 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:4,000). A detecção de proteínas foi realizada através de quimioluminescência utilizando um kit ECL comercial (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Grã-Bretanha). A densidade das bandas específicas foi quantificada com um densitômetro de imagem Software (Scion Image, Maryland, MA) (Tuñon *et al.*, 2013).

#### 3.3.2.4.4.2 Avaliação da Expressão das Proteínas NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$ pela Técnica de Imunohistoquímica

A expressão das proteínas Fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) foram determinados através de análise imunohistoquímica. A recuperação antigênica foi estabelecida usando um tampão a 100°C e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com metanol absoluto. As lâminas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho (NF- $\kappa$ B [sc-9072], 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo monoclonal de cabra (TNF- $\alpha$  [sc- 1351], 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) “*overnight*” a uma temperatura de 4°C.

As lâminas foram lavadas com tampão e incubadas com o anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004) durante 30 minutos em temperatura ambiente. O material foi analisado por um patologista sem conhecimento prévio dos grupos do trabalho, utilizando um microscópio equipado com uma câmera digital para capturar imagens usando o programa Image-Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). A quantificação da expressão da NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  foi realizada via análise digital com Adobe Photoshop® CS3 extended 10.0, e envolveu a contagem dos pixels corados por análise imunohistoquímica. O nível da sua expressão foi determinado pela multiplicação da densidade média da imagem pela porcentagem de áreas positivamente coradas (áreas de coloração castanha) (Gaffey *et al.*, 1992).

#### 3.3.2.4.5 Biossegurança e Descarte de Resíduos

Os frascos, luvas e demais materiais contaminados foram devidamente descartados nos lixos de materiais específicos do HCPA, para posterior incineração. Os resíduos provenientes dos reagentes utilizados nas técnicas foram devidamente armazenados em frascos específicos e destinados ao Setor de Higienização responsável pelo procedimento correto de eliminação. Os demais resíduos não tóxicos foram descartados no sistema de esgoto comum.

#### 3.3.2.4.6 Análise Estatística

Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  SE. A significância estatística foi calculada usando *GraphPad InStat* versão 3.0 para Windows. A análise de variância (ANOVA) e o teste de *Student-Newman-Keuls* foram utilizados para múltiplas análises, com nível de significância estabelecido em 5% ( $P < 0,05$ ).

### 3.4 EXPERIMENTO IV

#### 3.4.1 Delineamento do estudo

Este estudo tem caráter experimental qualitativo e quantitativo, sendo realizada a indução da hipertensão portal por meio do modelo experimental de ligadura parcial de veia porta (LPVP), bem como a simulação do modelo em animais do grupo controle (SO).

#### 3.4.2 Delineamento experimental

##### 3.4.2.1 Animais

Foram utilizados 18 ratos machos Wistar ( $n=6$ ), com peso médio de 250 g, provenientes do biotério do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS. Durante o experimento, os animais foram mantidos no mesmo local em caixas plásticas de 47x34x18 cm, forradas com maravalha, em ciclos de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Água e a ração da marca Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil) foram oferecidas *ad libitum* diariamente.

##### 3.4.2.2 Considerações Bioéticas

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a legislação brasileira vigente para a prática da pesquisa científica com animais (Lei Federal nº



11.794/08) com políticas determinadas na Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, 2013.

#### 3.4.2.3 Grupos Experimentais

Para detectar uma diferença na magnitude de 1,5 desvio padrão (magnitude de efeito grande) mantendo-se um  $\alpha=0,05$  e  $\beta=90\%$ , foram calculados seis ratos por grupo ( $n=6$ ), totalizando 18 ratos. O modelo utilizado para a indução da hipertensão portal foi a ligadura parcial de veia porta (LPVP), e os animais divididos em quatro grupos experimentais.

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

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

III. 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 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.

### 3.4.2.4 Procedimentos Experimentais

#### 3.4.2.4.1 Desenvolvimento do Modelo de Hipertensão Portal

Os animais foram anestesiados com cetamina 100 mg/Kg e xilazina 10 mg/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 20 G foi colocada sobre a veia porta e ambas amarradas em fio de seda 3.0. Após, a agulha foi retirada delicadamente, deixando o vaso parcialmente obstruído, sendo necessária a certificação da não ocorrência de trombose da veia porta durante sua manipulação (Sikuler *et al.*, 1985).

As alças intestinais foram colocadas no abdome e, com pontos contínuos, fechou-se o peritônio, infundindo-se anteriormente cerca de 10 mL de solução fisiológica na cavidade abdominal. O peritônio foi suturado utilizando um fio vicryl 4.0 e a parede exterior com pontos isolados utilizando fio mono 4.0. Uma solução antiséptica foi aplicada e os animais mantidos em incubadora até plena recuperação pós-cirúrgica, antes de serem direcionados para sua respectiva gaiola. Após os animais recuperarem-se da anestesia em caixas individuais, forradas com maravalha e em incubadoras para recém-nascidos (aquecimento e suporte de oxigênio), foram analgesiados no pós-operatório com dipirona (200 mg/Kg), sendo a primeira administração intramuscular e as posteriores por via oral (6 gotas) (500 mg/kg), com frequência de 8/8 horas por 72h.

Os animais controles ou operados ficticiamente (SO) sofreram o mesmo procedimento, não tendo, no entanto, a veia porta parcialmente ligada. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, devidamente supervisionados até o dia do experimento.

#### 3.4.2.4.2 Administração do Veículo e da N-acetilcisteína

O tratamento diário com a NAC iniciou-se a partir do 8º dia do procedimento cirúrgico por via intraperitoneal, na dose de 10 mg de N-

acetilcisteína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA: CAS registry number 616-91-1) por Kg de peso do animal (Vercelino *et al.*, 2008), diluída em 0,6 mL de veículo. Os animais controle receberam somente o veículo (solução fisiológica-NaCl 0,9%) no mesmo volume.

#### 3.4.2.4.3 Obtenção das Amostras de Tecido, Sangue e Morte dos Animais

Transcorridos quinze dias do desenvolvimento do modelo experimental e tratamento, 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. Posteriormente, realizou-se tricotomia da região abdominal, seguida de uma laparotomia ventral média, para que as alças intestinais fossem expostas. Uma porção de cerca de 8 cm do intestino grosso foi retirada para as posteriores análises, da seguinte forma:

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

2º) O restante do intestino grosso foi pesado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises de lipoperoxidação, enzimas antioxidantes e *Western blot*.

Ao final do experimento, os animais sofreram eutanásia por exanguinação sob anestesia profunda, conforme descrito em *AVMA Guidelines from Euthanasia* (AVMA, 2007).

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

#### 3.4.2.4.4 Análises Laboratoriais

##### 3.4.2.4.4.1 Avaliação da Expressão das Proteínas NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$ pela Técnica de Imunohistoquímica

A expressão das proteínas fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) foram determinadas através de análise imunohistoquímica. A recuperação antigênica foi estabelecida usando um tampão a 100°C e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com metanol absoluto. As lâminas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho (NF- $\kappa$ B [sc-9072], 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo monoclonal de cabra (TNF- $\alpha$  [sc- 1351], 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) “overnight” a uma temperatura de 4°C. As lâminas foram lavadas com tampão e incubadas com o anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004) durante 30 minutos em temperatura ambiente. O material foi analisado por um patologista sem conhecimento prévio dos grupos do trabalho, utilizando um microscópio equipado com uma câmera digital para capturar imagens usando o programa Image-Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). A quantificação da expressão da NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  foi realizada via análise digital com Adobe Photoshop® CS3 extended 10.0, e envolveu a contagem dos pixels corados por análise imunohistoquímica. O nível da sua expressão foi determinado pela multiplicação da densidade média da imagem pela porcentagem de áreas positivamente coradas (áreas de coloração castanha) (Gaffey *et al.*, 1992).

##### 3.4.2.4.4.2 Avaliação da Expressão da Proteína iNOS pela Técnica de Western blot

A análise de *Western blot* foi feita em extrato citosólico preparado a partir do homogeneizado de intestino. A fracção sobrenadante foi recolhida e armazenada a 80°C em alíquotas até a sua utilização. A concentração de proteína foi medida por Bradford (1976). As proteínas lisadas foram fraccionadas por electroforese em gel de sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). As membranas foram então bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado em solução salina

Trisbuffered contendo 0,05% de Tween 20 (TTBS) durante 1 hora à temperatura ambiente e sondadas durante a noite a 4°C com anticorpo policlonal de rato (NOS2 (sc-7271), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) em uma diluição de 1:200-1.000 com TTBS em 5% de leite em pós desnatado, e anticorpo anti- $\beta$ -actina (42 kDA) (Sigma Aldrich, StLouis, MO, USA) em uma diluição de 1: com TTBS em 5% de leite em pós desnatado. Após lavagem com TTBS, as membranas foram incubadas durante 1h à temperatura ambiente com anticorpo secundário IgG-HRP sc-2005, e anti-goat donkey (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:4000). A detecção de proteínas foi realizada através de quimioluminescência utilizando um kit ECL comercial (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Grã-Bretanha). A densidade das bandas específicas foi quantificada com um densitômetro de imagem Software (Scion Image, Maryland, MA) (Tuñon *et al.*, 2013).

#### 3.4.2.4.4.3 Preparo do Homogeneizado

Uma porção do intestino grosso foi retirada, pesada e armazenada em freezer -80°C. Foram adicionados 5 ml de buffer fosfato (140 mM KCl, 20 mM fosfato, pH 7.4) por grama de tecido, e homogeneizados durante 1 min em Ultra-Turrax (IKA-WERK) na temperatura de 4°C. 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 (Llesuy *et al.*, 1985).

#### 3.4.2.4.4.4 Dosagem de Proteína

A concentração de proteínas no homogeneizado de intestino 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 (Bradford, 1976).

#### 3.4.2.4.4.5 *Determinação dos Níveis de Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico*

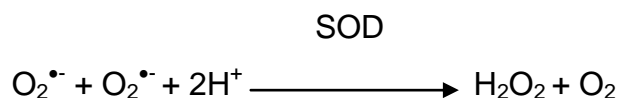
Com o intuito de avaliar a lipoperoxidação nos grupos presentes neste estudo, utilizamos o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A técnica de TBARS consiste no aquecimento do material homogeneizado na presença de ácido tiobarbitúrico e a consequente formação de um produto de coloração rósea, medido em espectrofotômetro a 535 nm. 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) 0,37%, 0,25 mL de água destilada, 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 15% e 0,25 mL 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 30 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 (612.8 x g) a 4°C. Por último, o produto foi retirado e a leitura em espectrofotômetro realizada (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBARS foi expressa em nmoles/mg de proteína (Buege e Aust, 1978).

#### 3.4.2.4.4.6 *Determinação da 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 atividade da enzima antioxidante SOD avalia a capacidade dessa enzima em inibir a reação do radical superóxido com epinefrina. Em uma micoplaca de 96 poços, foi colocada tampão glicina (50 mM pH 11), homogeneizado e a epinefrina (60 mM pH 2). Após foi feita agitação e a leitura realizada a 480 nm. Os dados são expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína (USOD/mg prot) (Misra e Fridovich, 1972).

#### 3.4.2.4.4.7 Determinação da Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase

A enzima GPx atua sobre o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) utilizando a GSH como doador de hidrogênios. A técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo a velocidade de oxidação do NADPH na presença de glutathione reduzida e de glutathione reductase em uma reação. Para tal, em uma cubeta de quartzo foram colocados solução reguladora de fosfatos potássios (100 mM, pH 7,0), glutathione reduzida (GSH) (40 mM), glutathione reductase (GR), NADPH (10 mM) e azida sódica (20mM) para a inibição da atividade da catalase. As amostras foram lidas numa absorvância de 340 nm e a atividade foi expressa em nmol/min/mg de proteína (Flohe *et al.*, 1973).

#### 3.4.2.4.5 Biossegurança e Descarte de Resíduos

Os frascos, luvas e demais materiais contaminados foram devidamente descartados nos lixos de materiais específicos do HCPA, para posterior incineração. Os resíduos provenientes dos reagentes utilizados nas técnicas foram devidamente armazenados em frascos específicos e destinados ao Setor de Higienização responsável pelo procedimento correto de eliminação. Os demais resíduos não tóxicos foram descartados no sistema de esgoto comum.

#### 3.4.2.4.6 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) seguida de teste *Student-Newman-Keuls* para múltiplas comparações, sendo o nível de significância adotado de 5% ( $P < 0,05$ ).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXPERIMENTO I

Apresentados no artigo I: *Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats*, publicado na revista *Annals of Hepatology*.

## Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats

Francieli Licks,\* Camila Marques,\*\* Cláudio Zetler,\*\*\*  
 Maria I. Morgan Martins,\*\*\*\* Cláudio A. Marroni,\*\*\*\*\* Norma P. Marroni\*,\*\*\*\*

\* Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Brazil.

\*\* Instituto de Tecnologia do Paraná-TECPAR, \*\*\* Universidade Luterana do Brasil, Brazil.

\*\*\*\* Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre-UFCSPA, Brazil.

### ABSTRACT

**Background.** Portal hypertension is a clinical syndrome associated with the development of a hyperdynamic circulation and gastroesophageal varices. **Aim.** To evaluate the antioxidant effect of N-acetylcysteine on portal hypertensive rats. **Material and methods.** Portal hypertension was induced by partial portal vein ligation (PPVL). 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.** 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. 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. N-acetylcysteine attenuated damage in gastric mucosa. **Conclusion.** Oxidative stress is associated with portal hypertension and that antioxidant NAC is able to minimize damages of PPVL in rats.

**Key words.** Partial portal vein ligation. Oxidative stress. Portal hypertension.

### INTRODUCTION

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.<sup>1</sup>

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 due to the

progressive dilatation of vessels that break and lead to hemorrhage.<sup>1</sup>

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, *et al.* and several experimental studies demonstrated that PPVL manifests gastric abnormalities equivalent to PHG in humans.<sup>2</sup> One week after PPVL the operated animals already develop PHG and approximately 100% of these animals present porto-systemic shunting and hyperdynamic circulation, in other words, collateral vessels.<sup>3</sup>

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 and to the overproduction of nitric oxide (NO).<sup>4</sup> Recently, increased NO serum levels were found in patients with portal hypertensive gastropathy, being implicated in the pathogenesis of this disease.<sup>5</sup> The enhanced synthesis of NO induces peroxynitrite formation by reaction to other reactive

Correspondence and reprint request: Francieli Licks, Msc.  
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil-Porto Alegre/RS,  
 Paulo Gama, 115, 90040-060.  
 Tel.: 51 (51) 3359-8937  
 E-mail: francieli.licks@gmail.com

Manuscript received: October 15, 2013.  
 Manuscript accepted: January 08, 2014.

species of oxygen, therefore increasing oxidative damage to the gastric mucosa.<sup>6</sup> 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 endogen antioxidant of humans. NAC can also decrease the bioavailability of nitric oxide by binding its thiol component with it and forming nitrosiol.<sup>7</sup> 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.

## MATERIAL AND METHODS

### Ethics

The experimental procedures complied with the rules established by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23 revised 1985).

### Animals

Twenty-four male Wistar rats weighing 250 g 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 47 x 34 x 18 cm lined with wood chips, under a 12-h dark/light cycle (light from 7 a.m. to 7 p.m.) at a temperature of  $22 \pm 4$  °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. 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 (100 mg/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 20 g 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.<sup>8</sup> 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 anesthetized 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 aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (FA).<sup>8</sup>

For the determination of AST and ALT in the plasma we used a commercial enzymatic method (Boehringer Mannheim, Germany). Thus, the enzymatic activity of AST and ALT was obtained by measuring kinetics at 567 nm. For determination of FA activity in plasma we employed an automated enzymatic method. For this purpose, we used as a substrate para-nitrophenyl and water, that forms para-nitrophenol, a yellow compound with a maximum absorbance of 400 nm.

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 anesthesia.<sup>9</sup>

### 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.<sup>2</sup>

### 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 Super-speed 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.<sup>10</sup>

### 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 min after addition of 500 µL of 0.37% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid and centrifuged at 3,000 rpm (1612.8 x g) for 10 min at 4 °C. Absorbance was determined spectrophotometrically at 535 nm and values were expressed in nmol/mgprot.<sup>11</sup>

### 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 min 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.<sup>12</sup>

### 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 ex-

pressed in U/mgprot.<sup>13</sup> Glutathione peroxidase (GPx) activity is based on the consumption of NADPH in the reduction of oxidized glutathione and values were expressed in nmol/mgprot.<sup>14</sup>

### 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 ± 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 liperoxidation 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).

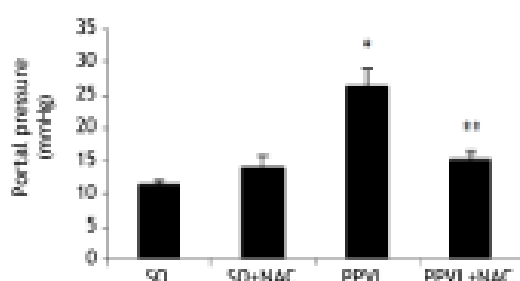
### Nitrates and nitrites levels

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).

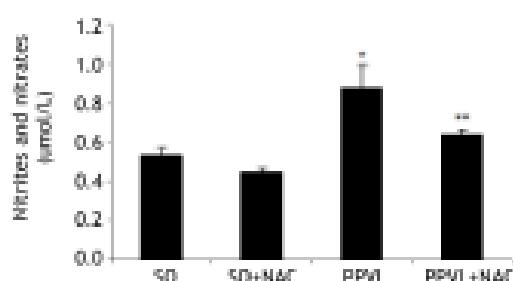
**Table 1.** Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on serum AST, ALT and FA activities.

	AST(U/L)	ALT(U/L)	FA(U/L)
SO	197.67 ± 20,8	42.83 ± 3,4	128.17 ± 10,1
SO+NAC	189.17 ± 22,0	35.17 ± 2,5	107.33 ± 11,2
PPVL	173.83 ± 14,6	46.40 ± 2,8	144.00 ± 13,8
PPVL+NAC	196.83 ± 24,8	35.20 ± 3,6	120.00 ± 14,6

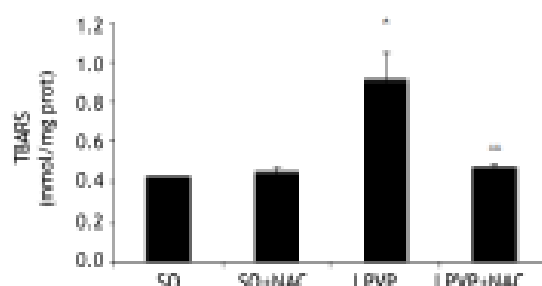
AST: aspartate aminotransferase. ALT: alanine aminotransferase. FA: alkaline phosphatase. SO: Sham-operated group. SO+NAC: Sham-operated treated with NAC group. PPVL: partial portal vein ligation group. PPVL + NAC: partial portal vein ligation group treated with NAC. There was no statistic difference between the sampled groups.



**Figure 1.** Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on partial pressure. SO: Sham-operated group. SO + NAC: Sham-operated treated with NAC group. PPVL: partial portal vein ligation group. PPVL + NAC: Partial portal vein ligation group treated with 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 nitrites and nitrites level. SO: Sham-operated group. SO + NAC: Sham-operated treated with NAC group. PPVL: partial portal vein ligation group. PPVL + NAC: partial portal vein ligation group treated with NAC. \*  $P < 0.01$  against sham-operated. \*\*  $P < 0.05$  against PPVL ( $n = 6$ ).



**Figure 2.** Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on gastric mucosa TBARS. SO: Sham-operated group. SO + NAC: Sham-operated treated with NAC group. PPVL: partial portal vein ligation group. PPVL + NAC: partial portal vein ligation group treated with NAC. \*  $P < 0.001$  against sham-operated. \*\*  $P < 0.001$  against PPVL ( $n = 6$ ).

#### 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 4A).

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 4B).

#### 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 (Figures 5A-5C). 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 5D).

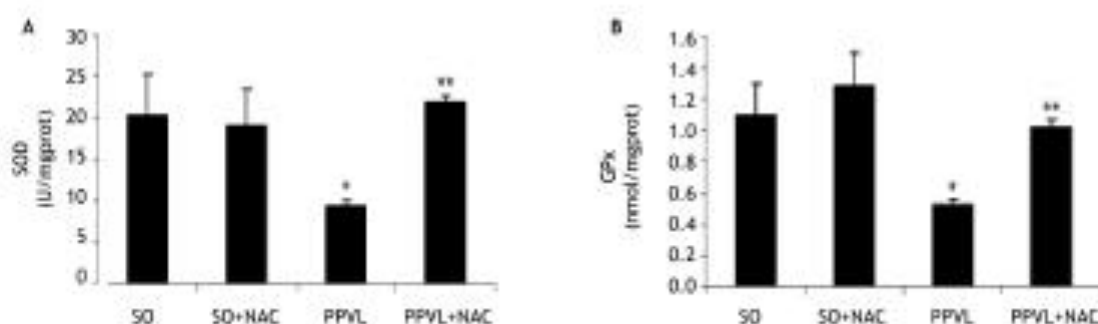


Figure 4. Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on gastric mucosa SOD (A) and GPx (B) enzyme. SO: Sham-operated group. SO + NAC: Sham-operated treated with NAC group. PPVL: partial portal vein ligation group. PPVL + NAC: Partial portal vein ligation group treated with NAC. A. \*  $P < 0.05$  against sham-operated. \*\*  $P < 0.05$  against PPVL (n = 6). B. \*  $P < 0.05$  against sham-operated. \*\*  $P < 0.05$  against PPVL (n = 6).

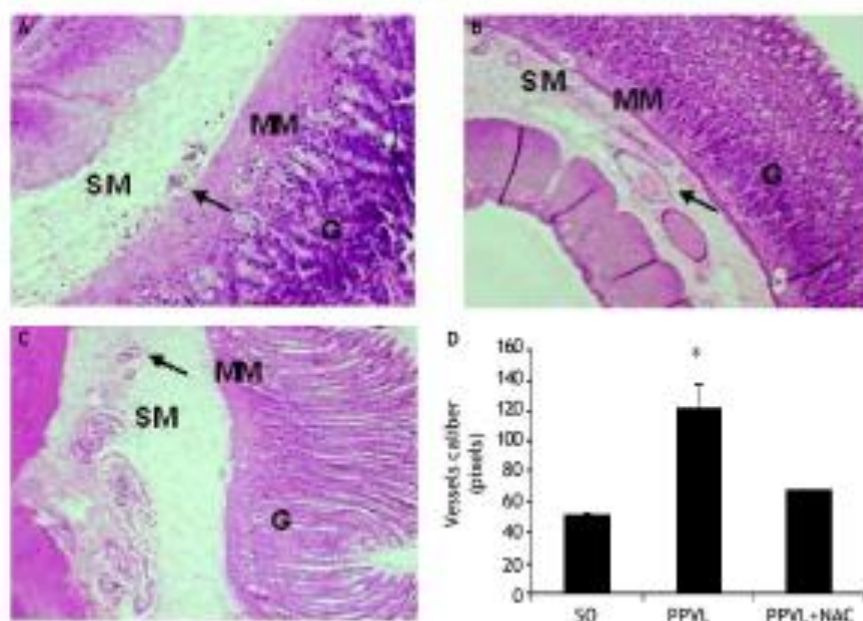


Figure 5. Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-Acetylcysteine (NAC) administration on gastric mucosa histology (A-C) and vessels caliber (D). A. Sham-operated group (SO). B. Partial portal vein ligation group (PPVL). C. Partial portal vein ligation group treated with NAC (PPVL + NAC). 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. D. 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.

## 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. The development of portal-systemic collaterals is a vascular response to the increased portal pressure.<sup>15</sup>

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. The vasodilation occurring in the stomach leads to portal hypertensive gastropathy.<sup>16</sup>

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.<sup>17</sup> Nitric oxide is a central mediator of the vasoreactive and angiogenic abnormalities observed in portal hypertension.<sup>18</sup> Investigators have concluded that enhanced NO synthesis contributes to the hyperdynamic circulation of PH, and therefore, oxidative stress.<sup>19</sup>

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.<sup>3</sup> In a pre-hepatic 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.<sup>20</sup> In this experimental model, all the effects are related to pre-hepatic portal hypertension, since there is no damage to the liver of these animals.<sup>21</sup>

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.<sup>22</sup>

N-Acetylcysteine (NAC) has ability to support endogenous antioxidants and modulate nitric oxide (NO) production during stressing situations, infections, toxic aggressions, and inflammatory conditions.<sup>23</sup> 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.

Recently, NAC was used in an experimental model of hepatic encephalopathy, a consequence of cirrhosis, with very promising results.<sup>24</sup> 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 confirmed previous studies which showed that PPVL does not effect any hepatocellular damage.<sup>18,21</sup> This experimental model does not inflict liver damage.<sup>25</sup>

We observed a significant increase in portal pressure in the PPVL group. This demonstrates the effectiveness of this experimental model and confirms previous studies performed in our laboratory.<sup>18,21</sup> NAC was able to reduce portal pressure, since it is able to modulate the production of nitric oxide.<sup>23</sup>

The overproduction of NO has a cytotoxic potential, enhancing mucosal injury (26). Previous studies performed by our group reported that the antioxidant treatment with glutamine and quercetin were able to reduce NO production, ameliorating the gastric mucosa integrity<sup>18,21</sup> such as in this study.

We observed increased lipoperoxidation in PPVL animals, and NAC administration was associated with significant decreases in these values. Lipoperoxidation was evaluated previously in this model through F<sub>2</sub>-Isoprostanes measurement, and NAC treatment was able to improve this condition, just as it did in the present study.<sup>22</sup>

The increased lipoperoxidation was accompanied by a significant decrease in SOD and GPx activities, and NAC reverted this, increasing them. These enzymes are known to be inhibited by radical reaction products, which are overproduced on PH. SOD is inhibited by hydrogen peroxide,<sup>27</sup> and GPx is inhibited by superoxide.<sup>28</sup> NAC was able to restore both enzymatic activities, enhancing antioxidant activity. Such result corroborates to a previous study in which NAC treatment resulted in similar results.<sup>29</sup>

In the histological analysis, we observed a modification in the architecture of the gastric mucosa of PPVL rats, which showed vasodilation. We also measured the vessels caliber, and observed the presence of this abnormality. NAC was able to attenuate this histological change inflicted by PPVL, by decreasing this parameter in this experimental model.

Different authors have demonstrated that PPVL rats show abnormalities of the gastric microvasculature similar to those observed in humans with PH.<sup>3</sup> Our group described previously that antioxidant treatment in experimental model of PPVL is able to ameliorate the gastric mucosa.<sup>18,23</sup>

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, an animal model of pre-hepatic portal hypertension. 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.

## ABBREVIATIONS

- **ALT**: alanine aminotransferase.
- **ANOVA**: one-way analysis of variance.
- **AST**: aspartate aminotransferase.
- **FA**: alkaline phosphatase.
- **GPx**: Glutathione peroxidase.
- **NAC**: N-Acetylcysteine.
- **NO**: nitric oxide.
- **PH**: portal hypertension.
- **PHG**: portal hypertensive gastropathy.
- **PPVL**: partial portal vein ligation.
- **ROS**: reactive oxygen species.
- **SO**: Sham-operated.
- **SOD**: superoxide dismutase.
- **TBARS**: thiobarbituric acid reactive substances.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff at Laboratory of Experimental Hepatology and Physiology and Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants for their excellent scientific support.

## FINANCIAL SUPPORT

Supported by grants from the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Foundation for research in the state of Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA-11-0298), and Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology (HCPA/UFRGS) of the Federal University do Rio Grande do Sul (UFRGS) and Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants.

## REFERENCES

1. Bosh J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes J. The management of portal hypertension: Rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol* 2008; 48: S68-S92.
2. Sikuler E, Kravetz D, Grossmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985; 248: G618-G625.
3. Abraldes JG, Pizarin M, Garcia-Pagan JC. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2009; 12: 6577-84.
4. Marley R, Holt S, Fernando B, Harry D, Anand R, Goodier D, Davies S, et al. Lipotic acid prevents development of the hyperdynamic circulation in anesthetized rats with biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999;29: 1358-63.
5. Seckin Y, Harputluoglu MM, Batcioglu K, Karincacoglu M, Yildirim B, Oner RI, Uyumlu B, et al. Gastric tissue oxidative changes in portal hypertension and cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1154-E.
6. Ohta M, Tanoue K, Tamaoki AS, Pai R, Itami RM, Sander FC, Sugimachi K, et al. Overexpressed nitric oxide synthase in portal-hypertensive stomach of rat: a key to increased susceptibility to damage? *Gastroenterology* 1997; 112: 1920-30.
7. Failli P, Palmieri L, D'Alfonso C, Giovannelli L, Generini S, Rosso AD, Pignone A, et al. Effect of N-acetyl-L-cysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis. *Nitric Oxide* 2002; 7: 277-82.
8. Halperin BH, Pacaud A. Technique of obtaining blood samples from small laboratory animals by puncture of ophthalmic plexus. *C R Seances Soc Biol Fil* 1951; 145: 1465-6.
9. AVMA. Guidelines for the euthanasia of animals 2013; 231:1-102.
10. 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; 72: 248-54.
11. Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 102-10.
12. Granger DL, Anstey NH, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol* 1999; 301: 49-61.
13. Nitta HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-5.
14. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-21.
15. Colle I, Goerts AH, Van-Steenkiste C, Vlierbergue Hans-Yan. Hemodynamic Changes in Splanchnic Blood Vessels in Portal Hypertension. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 391: 699-13.
16. Al-Busafi SA, McLabb-Balter J, Farag A, Hilzenrat H. Clinical manifestations of portal hypertension. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 203794.
17. Novo E, Parola H. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008; 1: 5.
18. Moreira AJ, Fraga C, Alamo M, Collado P, Zetter C, Naranjo NP. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1939-46.
19. Langer D, Shan Y. Nitric oxide and portal hypertension: interface of vasoreactivity and angiogenesis. *J Hepatol* 2006; 44: 209-16.



20. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983; 244: G52-G57.
21. Marques C, Hauriz JL, Simonetto D, Mannoni CA, Tuñon AJ, Mannoni MP, González-Gallego J. Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy. *Ann Hepatol* 2011; 10: 531-9.
22. Fernando S, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, Smith R, et al. N-Acetylcysteine Prevents Development of the Hyperdynamic Circulation in the Portal Hypertensive Rat. *Hepatology* 1998; 28: 689-94.
23. Millaa PJ. N-Acetylcysteine: Multiple Clinical Applications. *Am Fam Physician* 2009; 80: 365-9.
24. Bémour C, Yagüero J, Desjardins P, Butterworth RF. N-acetylcysteine attenuates cerebral complications of non-acetaminophen-induced acute liver failure in mice: antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Metab Brain Dis* 2010; 25: 241-9.
25. 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.
26. Lopez-Belmonte J, Whitte BJR, Moncada S. The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 73-8.
27. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 1975; 14: 5294-9.
28. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240: 500-8.
29. 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.

## 4.2 EXPERIMENTO II

Apresentados no artigo II: *N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats*, publicado na revista *World Journal of Gastroenterology*.



## Basic Study

## N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats

Francieli Licks, Renata Minuzzo Hartmann, Camila Marques, Elizângela Schemitt, Josieli Raskopf Colares, Mariana do Couto Soares, Juliana Reys, Camila Fisher, Juliana da Silva, Norma Fossa Marroni

Francieli Licks, Renata Minuzzo Hartmann, Elizângela Schemitt, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90040-060, Brazil

Camila Marques, Instituto de Tecnologia do Paraná, Curitiba 90040-060, Brazil

Josieli Raskopf Colares, Mariana do Couto Soares, Juliana Reys, Camila Fisher, Juliana da Silva, Norma Fossa Marroni, Universidade Luterana do Brasil, Canoas 92425-900, Brazil

**Author contributions:** Licks F, Hartmann RM, Marques C, Schemitt E, Colares JR, Soares MC, Reys J and Fisher C contributed equally to this work; Marroni NP designed the research; Licks F, Hartmann RM, Schemitt E, Colares JR and Soares MC performed the research; Reys J, da Silva J contributed new reagent/analytic tools; Licks F and Hartmann RM analyzed the data, and Licks F wrote the paper.

**Supported by Brazilian agencies** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos - Hospital de Clínicas of Porto Alegre (PIPE) project nº 11-0293; the Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology (HCPA/UFRRGS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul; and the Oxidative Stress and Antioxidants Laboratory, Universidade Luterana do Brasil.

**Institutional review board statement:** The study was reviewed and approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Universidade Luterana do Brasil's Institutional Review Board.

**Institutional animal care and use committee statement:** All procedures involving animals were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (11-0293).

**Conflict-of-interest statement:** The authors of the present study declare no conflict-of-interest.

**Data sharing statement:** Technical appendix, statistical code, and dataset available from the corresponding author at francieli.licks@gmail.com. Participants gave informed consent for data sharing. No additional data are available.

**Open Access:** This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Correspondence to:** Francieli Licks, MSc, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90040-060, Brazil. francieli.licks@gmail.com.br  
 Telephone: +55-51-33598097

Received: March 25, 2015

Peer-review started: March 27, 2015

First decision: April 24, 2015

Revised: May 14, 2015

Accepted: July 18, 2015

Article in press: July 18, 2015

Published online: November 21, 2015

### Abstract

**AIM:** To evaluate the antioxidant effect of N-acetylcysteine (NAC) on the stomach of rats with portal hypertension.

**METHODS:** Twenty-four male Wistar rats weighing  $\pm$  250 g were divided into four experimental groups ( $n =$

6 each): Sham-operated (SO), SO + NAC, partial portal vein ligation (PPVL), and PPVL + NAC. Treatment with NAC in a dose of 10 mg/kg (i.p.) diluted in 0.6 mL of saline solution was administered daily for 7 d starting 8 d after the surgery. Animals from the PPVL and SO group received saline solution (0.6 mL) for the same period of time as the PPVL + NAC and SO + NAC group. On the 15<sup>th</sup> day the animals were anesthetized and we evaluated portal pressure by cannulating mesenteric artery. After, we removed the stomach for further analysis. We performed immunohistochemical analysis for endothelial nitric oxide synthase (eNOS), vascular endothelial growth factor (VEGF), and nitrotyrosine (NTT) proteins in stomach. We also evaluated eNOS and VEGF by Western blot analysis and assessed DNA damage in blood samples by the comet assay.

**RESULTS:** The portal hypertension group exhibited increases in portal pressure when compared to SO group ( $29.8 \pm 1.8$  vs  $12.0 \pm 0.3$  mmHg) ( $P < 0.001$ ). The same was observed when we compared the eNOS ( $56.8 \pm 3.7$  vs  $13.46 \pm 2.8$  pixels) ( $P < 0.001$ ), VEGF ( $34.9 \pm 4.7$  vs  $17.46 \pm 2.6$  pixels) ( $P < 0.05$ ), and NTT ( $39.01 \pm 4.0$  vs  $12.77 \pm 2.3$  pixels) ( $P < 0.05$ ) expression by immunohistochemistry of the PPVL animals with the SO group. The expression of eNOS ( $0.39 \pm 0.03$  vs  $0.25 \pm 0.03$  a.u.) ( $P < 0.01$ ) and VEGF ( $0.38 \pm 0.04$  vs  $0.26 \pm 0.04$  a.u.) ( $P < 0.01$ ) were also evaluated by Western blot analysis, and we observed an increase of both proteins on PPVL animals. We also evaluated the DNA damage by comet assay, and observed an increase on damage index and damage frequency on those animals. NAC decreased portal pressure values in PPVL + NAC animals ( $16.46 \pm 2$  vs  $29.8 \pm 1.8$  mmHg) ( $P < 0.001$ ) when compared to PPVL. The expression of eNOS ( $14.60 \pm 4.1$  vs  $56.8 \pm 3.7$  pixels) ( $P < 0.001$ ), VEGF ( $19.53 \pm 3.2$  vs  $34.9 \pm 4.7$  pixels) ( $P < 0.05$ ) and NTT ( $21.84 \pm 0.7$  vs  $39.01 \pm 4.0$  pixels) ( $P < 0.05$ ) evaluated by immunohistochemistry were also reduced in PPVL + NAC animals. Also, when evaluated by Western blot eNOS expression ( $0.32 \pm 0.03$  vs  $0.39 \pm 0.03$  a.u.) ( $P < 0.05$ ) and VEGF expression ( $0.31 \pm 0.09$  vs  $0.38 \pm 0.04$  a.u.) ( $P < 0.01$ ). Furthermore, NAC modulated DNA damage in PPVL + NAC animals.

**CONCLUSION:** In view of these results, we believe NAC is able to protect the stomach from the alterations induced by the PPVL procedure.

**Key words:** N-Acetylcysteine; Portal hypertension; Gastropathy; Oxidative stress; Antioxidant

© The Author(s) 2015. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Care 6p:** Portal hypertension (PH) is a syndrome with serious manifestations as ascites, hepatic encephalopathy and development of collateral circulation, characterized by vasodilation and angiogenesis. This mechanism, intended to divert blood from the site

of obstruction, is the leading cause of death among these patients, since it leads to upper gastrointestinal bleeding. Therapies that may contribute to control the development of collateral circulation are been investigated in an attempt to improve the quality of life of PH patients. This paper proposes a novel therapy, using an antioxidant effective in reducing this collateral circulation in an animal model of portal hypertension.

Licks F, Hartmann RM, Marques C, Schemitt E, Colares JR, Soares MC, Reys J, Fisher C, da Silva J, Mazoni NP. N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol* 2015; 21(48): 12351-12360 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i48/12351.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i48.12351>

## INTRODUCTION

Portal hypertension (PH) is characterized by a progressive increase in pressure within the hepatic portal system, with development of hyperdynamic circulation and a pressure gradient in the portal system (the difference between the pressure in the portal vein and the hepatic veins) exceeding 5 mmHg<sup>[1]</sup>.

Conditions in which portal blood flow is reduced or obstructed by an anatomic obstacle are the determinants of PH pathogenesis. When an anatomic obstacle arises, vascular resistance to flow increases, contributing to the development of PH<sup>[2]</sup>. Depending on the location of this obstacle to blood flow, PH may be classified as pre-hepatic (portal or splenic vein thrombosis), intra-hepatic (cirrhosis), or post-hepatic (inferior vena cava thrombosis), among other examples<sup>[3]</sup>.

The result of increased vascular resistance in the splanchnic circulation is increased pressure within the portal system. This leads to the development of a collateral circulation in an attempt to decompress the system, shunting blood directly into the systemic circulation, and increasing local venous blood flow through vasodilation<sup>[4]</sup>. Vasodilation in the splanchnic territory leads to the development of varices, particularly in the stomach. Gastric varices can be located from the fundus to the upper third of the stomach, and are caused by exacerbated dilation of blood vessels secondary to PH<sup>[5]</sup>.

Among the various vasoactive substances implicated in the development of a splanchnic collateral circulation, nitric oxide is the key mediator involved in this process. Vasodilation and the formation of portosystemic collaterals contribute to increased blood flow and worsen PH, increasing the risk of upper gastrointestinal bleeding<sup>[6]</sup>. Nitric oxide derived from endothelial nitric oxide synthase (eNOS) plays a major role in the pathophysiology of PH. Nitric oxide is a potent vasodilator, and acts not only on the splanchnic

circulation but also on the arterial circulation. It diffuses into smooth muscle cells and activates guanylate cyclase, producing cyclic guanosine monophosphate and thus contributing to the excessive vasodilation observed in PH<sup>22</sup>.

The pathways of eNOS activation include endothelial stimuli such as shear stress, proinflammatory cytokines, and vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>23,24</sup>.

The angiogenesis process, characterized by the formation of new blood vessels from preexisting ones, also contributes to the development and persistence of the collateral circulation. The role of VEGF in this process has been established by experimental studies in which it was shown to be the main angiogenic mediator in rats with PH. VEGF appears to contribute to the deterioration of PH by stimulating the development of portosystemic collaterals and increasing the permeability of the mesenteric microvasculature<sup>25,26</sup>.

The role of oxidative stress in the vascular dysfunction of PH has been well established in the literature<sup>22,23</sup>. The overproduction of nitric oxide caused by the vascular abnormalities present in portal hypertension facilitates the reaction of NO to superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and forms peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) contributing to an increase in oxidative phenomena<sup>24</sup>. The reactive oxygen species that characterize oxidative stress have the potential to bind to proteins, break DNA, and induce cell damage by interactions with various cell components. This phenomenon is associated with a series of disorders, including PH<sup>27</sup>.

N-Acetylcysteine (NAC) is a compound that has been widely used in clinical practice for decades: as a mucolytic agent; in the management of ischemia-reperfusion injury; in acute respiratory distress syndrome and bronchitis; in the treatment of paracetamol toxicity and heavy metal poisoning; in HIV; and in psychiatric disorders. Its broad indications are due to its extensive antioxidant effects, which are attributable to its ability to react rapidly with <sup>•</sup>OH, <sup>•</sup>NO, CO<sup>•</sup>, and thyl radicals, as well as to replenish vital cell components depleted by injury<sup>28</sup>.

Within this context, the aim of the present study was to assess the effects of the antioxidant NAC in a rat model of PH, while evaluating the involvement of oxidative stress, vascular damage, and DNA damage in PH.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics

All animal-related procedures were performed in compliance with the guidelines of the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), state of Rio Grande do Sul, Brazil, and with the United States National Academy of Sciences Principles for Research Involving Animals<sup>29</sup>.

Licks F *et al.* N-acetylcysteine in portal hypertensive rats

### Animals

We used 24 male Wistar rats, weighing 250 g each, obtained from the HCPA vivarium. All were kept in plastic bin cages, measuring 47 cm × 34 cm × 18 cm and lined with wood chips, under a 12-h dark/light cycle (lights on from 7 a.m. to 7 p.m.), at a controlled temperature of 22 ± 4 °C. The rats were fed commercially available chow (Purina<sup>®</sup> - Nutrilpa, Porto Alegre, RS, Brazil), 16 g/d, and had access to water *ad libitum*.

### Groups and treatment protocols

Animals were divided into four experimental groups (n = 6 each): sham-operated (SO), SO + NAC, partial portal vein ligation (PPVL) and PPVL + NAC. NAC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, United States; CAS registry number 616-91-1) was administered at a dose of 10 mg/kg, intraperitoneally, dissolved in 0.6 mL of normal saline solution (0.9% NaCl). This dose was based on previous studies performed by our research group<sup>28</sup>. Treatment was administered once daily for 7 d, starting on day 8 after surgery. Animals in the PPVL and SO groups received the same volume of saline solution, for the same period, instead of NAC.

### Induction of portal hypertension

The animals were initially anesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg i.p.) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg i.p.). After induction of anesthesia, a midline laparotomy was performed and the bowels were gently retracted with a gauze pad soaked in saline. Briefly, the portal vein was isolated using 3-0 silk and a 20G needle was placed in front of it to establish PPVL. Both the portal vein and the needle were tied using the silk suture and the needle was withdrawn. The SO group underwent a sham version of the same procedure, in which the portal vein was not ligated<sup>28</sup>.

### Euthanasia

On day 15 after surgery, animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg i.p.). Blood was collected from the retro-orbital plexus using a heparinized capillary tube and stored in heparinized Eppendorf microtubes for later assessment of DNA damage<sup>28,31</sup>. After blood sampling, the abdomen was shaved and a laparotomy performed. Portal pressure was measured by cannulation of the mesenteric vein with a catheter coupled to a polygraph (Poligraph 2006, Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain)<sup>28</sup>. The animals were then killed by exsanguination under deep anesthesia<sup>28</sup> and we collected the stomach for the posterior analyzes. A piece of the stomach sample was frozen and stored at -80 °C and another piece was cut and fixed in 10% buffered formalin for 24 h. Paraffin blocks were cut with a rotatory microtome to create 3-mm sections.

Licks F *et al.* N-acetylcysteine in portal hypertensive rats

#### Immunohistochemistry

Expression of eNOS, VEGF, and nitrotyrosine (NTT) antibody in stomach tissue was determined by immunohistochemical analysis. Antigen retrieval was performed using buffer at 100 °C, and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation with absolute methanol. Slides were incubated with rabbit polyclonal antibody (NOS3 C-20 (sc-654), 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States), mouse monoclonal antibody (VEGF C-1 (sc-7269), 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States), and rabbit polyclonal antibody (Nitro-Tyrosine Antibody (#9691), 1:200, Cell Signaling Technology) overnight at 4 °C, then washed with buffer and incubated with secondary antibodies for eNOS (goat anti-rabbit IgG-HRP 2004), VEGF (goat anti-mouse IgG-HRP 2005), and NTT (anti-rabbit IgG-HRP 7074) for 30 min at room temperature. The slides were analyzed by a pathologist without prior knowledge of group allocation using a microscope coupled to a digital camera. Images were captured using Image-Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, United States). Quantification of eNOS, VEGF, and NTT antibody expression was performed via digital analysis in Adobe Photoshop® CS3 Extended 10.0 and involved counting pixels of areas stained by the immunohistochemical reagents. The level of expression was determined by multiplying the average density of the image by the percentage of positively stained areas (areas of brown staining)<sup>22</sup>.

#### Western blot analysis

Western blot analysis was performed in cytosolic extract prepared from stomach homogenates. The supernatant fraction was collected and stored at 80 °C in aliquots until use. Protein concentration was measured as described by Bradford (1976). Lysate proteins were fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes<sup>24,25</sup>. The membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TTBS) for 1 h at room temperature and probed overnight at 4 °C with rabbit polyclonal antibody [NOS3 C-20 (sc-654), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States], mouse monoclonal antibody [VEGF C-1 (sc-7269), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States], at 1:200-1000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk, and anti- $\beta$ -actin (42 kDa) antibody (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, United States) at 1:1000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary HRP-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States, 1:4,000). Protein detection was performed via chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Great

Britain)<sup>26</sup>. The density of the specific bands was quantified with imaging densitometry software (Scion Image, Maryland, MA).

#### Comet assay

The alkaline comet assay was carried out as described elsewhere<sup>27</sup>, with minor modifications<sup>28</sup>. Blood samples (50  $\mu$ L) were placed in 5  $\mu$ L of anticoagulant (heparin sodium, 25000 IU, Lliquaemin®). Blood cell suspensions (5  $\mu$ L) were embedded in 95  $\mu$ L of 0.75% low melting point agarose (Gibco BRL) and spread on agarose-precoated microscope slides. After solidification, slides were placed in lysis buffer (2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, and 10 mmol/L Tris, pH 10.0), with freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% DMSO for 48 h at 4 °C. The slides were subsequently incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mmol/L NaOH and 1 mmol/L EDTA, pH > 13) for 20 min at 4 °C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to perform DNA electrophoresis. The slides were then neutralized (0.4 mol/L Tris, pH 7.5), stained with silver, and viewed under a microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) from each animal were analyzed. Cells were also visually scored according to tail size into five classes, ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal and, consequently, for each studied group. The damage index (DI) could thus range from 0 (completely undamaged, 100 cells  $\times$  0) to 400 (maximum damaged, 100 cells  $\times$  4). The damage frequency (%) was calculated on the basis of the number of tailed versus tailless cells.

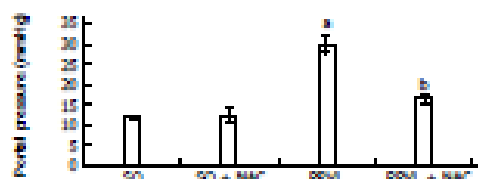
#### Statistical analysis

All data are presented as mean  $\pm$  SE. Statistical significance was calculated using GraphPad InStat, version 3.0 for Windows. Analysis of variance and the Student-Newman-Keuls method were used for multiple analysis. For the comet assay, the normality of variables was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test, and statistical differences between groups were analyzed using the nonparametric two-tailed Kruskal-Wallis test with Dunn's correction for multiple comparisons. Student's *t*-test was used to compare damage between negative and positive controls. The critical level for rejection of the null hypothesis was considered to be a *P* value of < 0.05 (i.e., a significance level of 5%).

## RESULTS

#### Portal pressure measurement

We observed a statistically significant increase in portal pressure values in the PPVL group as compared to SO animals (*P* < 0.001). In the NAC-treated group, these values were significantly decreased (*P* < 0.001) (Figure



**Figure 1** Portal pressure. Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on portal pressure.  $^*P < 0.001$  against SO,  $^bP < 0.001$  against PPVL ( $n = 8$ ). SO: Sham-operated group; SO + NAC: Sham-operated animals treated with NAC; PPVL: Partial portal vein ligation group; PPVL + NAC: Partial portal vein ligation group treated with NAC.

1).

#### Immunohistochemistry

Immunohistochemical analyses for eNOS (Figure 2A;  $P < 0.001$ ), VEGF (Figure 2B;  $P < 0.05$ ) and NTT (Figure 2C;  $P < 0.05$ ) showed that animals in the PPVL group had samples markedly positive for all three proteins. NAC treatment reduced expression of eNOS, VEGF, and NTT in stomach tissue.

#### Western blot analysis

Expression of eNOS (Figure 3A;  $P < 0.05$ ) and VEGF (Figure 3B;  $P < 0.01$ ) was increased in PPVL animals as compared with the SO group. Conversely, expression of these proteins was reduced in the PPVL + NAC group when compared with the PPVL group.

#### Comet assay

The comet assay revealed an increased DNA damage index (Figure 4A) and increased frequency of damage in blood samples (Figure 4B) in PPVL group animals. NAC treatment reduced both of these parameters, thus demonstrating the ability of NAC to modulate DNA damage in this experimental model.

## DISCUSSION

PH is the main complication of cirrhosis, and is one of the leading causes of mortality in patients with chronic liver disease. The increased vascular resistance and blood flow present in PH are determining causes that elevate the portal pressure gradient, shunting blood from the liver into the systemic circulation. The subsequent formation of collateral vessels due to the NO overproduction is implicated in gastroesophageal bleeding, hepatic encephalopathy, and sepsis<sup>[27]</sup>.

The search for medications that can prevent or mitigate this increase in portal pressure is extremely relevant. In the present study, we sought an alternative based on the close relationship between PH and oxidative stress and on the involvement of nitric oxide in this setting.

NAC is an antioxidant with a well-established mechanism of action, based on its ability to restore glutathione levels and act as a free radical

scavenger<sup>[28]</sup>. Furthermore, NAC modulates nitric oxide through interactions of its thiol component with NO to form nitrosothiol<sup>[29]</sup>.

The increased portal pressure observed in rats subjected to PPVL corroborates the findings of previous studies<sup>[20,21]</sup> and demonstrates the efficacy of the experimental model used in this study. NAC treatment effectively reduced pressure in the portal system in PPVL + NAC animals (Figure 1). Similar results were obtained in a prior study by our research group, in which NAC was found to reduce portal system pressures as a result of its ability to modulate nitric oxide and its antioxidant properties<sup>[20]</sup>.

The ability of NAC to modulate nitric oxide bioavailability led to a reduction in eNOS expression in the gastric mucosa of portal hypertensive rats treated with NAC (PPVL + NAC), as assessed by immunohistochemistry (Figures 2A-C) and Western blot analysis (Figures 3A and B).

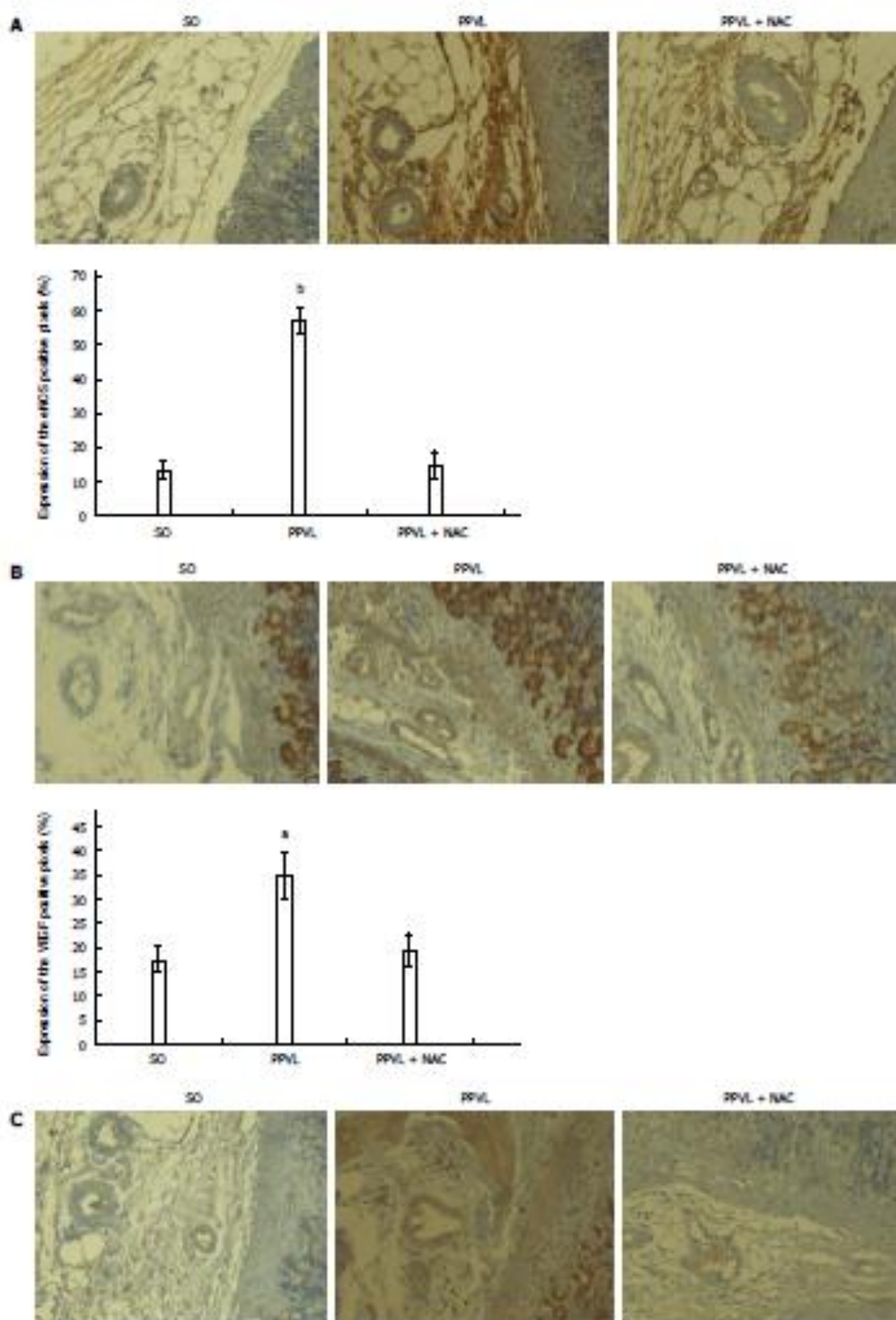
NO synthases are enzymes that play an essential role in the control of nitric oxide biosynthesis. The three main isoforms are inducible NO (iNOS) and two constitutive forms, nNOS and eNOS<sup>[30]</sup>. Nitric oxide produced by endothelial cells (eNOS) plays a major role in vascular smooth muscle relaxation. Under physiologic conditions, NO release is stimulated by acetylcholine, bradykinin, and adenosine triphosphate, among other mediators. Furthermore, the friction of circulating blood cells against vessel walls triggers eNOS-mediated nitric oxide synthesis via a shear stress mechanism to increase nitric oxide<sup>[30]</sup>.

In PH, development of a hyperdynamic circulation is associated with nitric oxide overproduction, and portal hypertensive gastropathy is associated with the hemodynamic changes caused by NO triggering<sup>[20]</sup>. In the present study, the PPVL model caused an increase in portal system pressure and, consequently, increased eNOS immunoreactivity and expression in the gastric mucosa of rats in the PPVL group (Figures 2A and 3A). In a previous study, NAC reduced splanchnic vasodilation by reducing NO levels in an experimental model of cirrhosis induced by common bile duct ligation<sup>[20]</sup>. Our research group found a similar effect of NAC in rats with hepatopulmonary syndrome<sup>[20]</sup>.

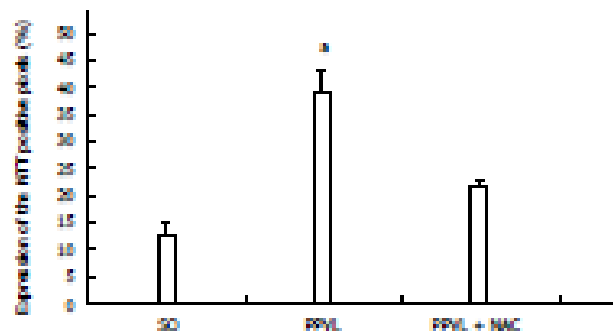
Nitric oxide toxicity is particularly prevalent in oxidative stress settings. The high reactivity of NO with molecules such as the superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) produces highly injurious compounds, such as peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ), which may trigger nitrosative stress<sup>[31]</sup>. As PH is directly associated with oxidative stress and nitric oxide overproduction, it is to be expected that synthesis of reactive metabolites will occur, potentiating the pathophysiological changes observed in this syndrome.

This finding was proven by analysis of immunoreactivity to NTT in the gastric mucosa of study animals. We observed increased NTT reactivity in PPVL group animals (Figure 2C). The peroxynitrite generated during interactions of nitric oxide with the

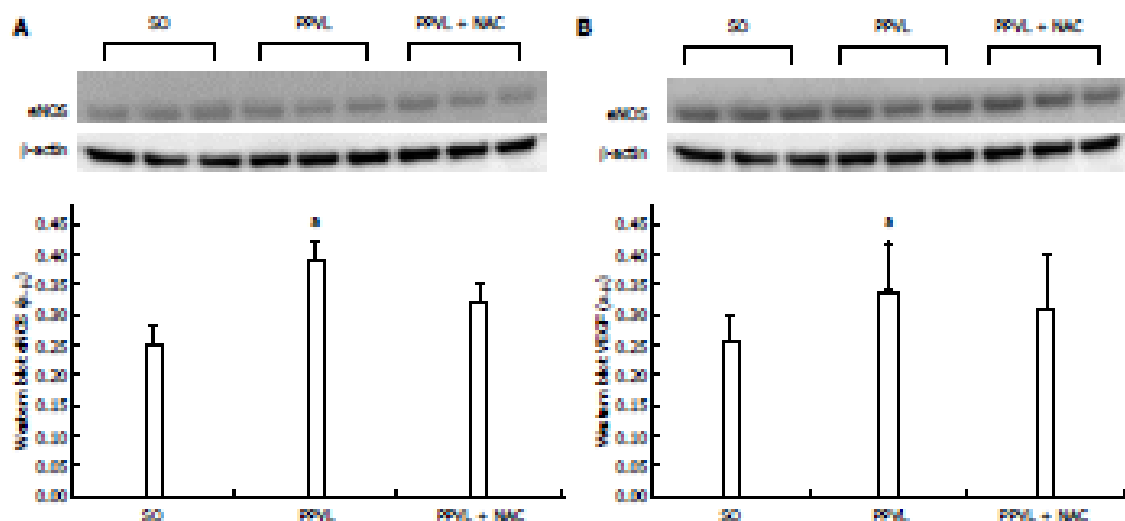
Lluis F *et al.* N-acetylcysteine in portal hypertensive rats







**Figure 2** Immunohistochemistry for endothelial nitric oxide synthase, vascular endothelial growth factor and nitrotyrosine. A: Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on eNOS immunoreactivity in gastric mucosa,  $^{*}P < 0.001$  ( $n = 6$ ); B: Effects of partial PPVL and NAC administration on VEGF immunoreactivity in gastric mucosa,  $^{*}P < 0.05$  ( $n = 6$ ); C: Effects of PPVL and NAC administration on NTT immunoreactivity in gastric mucosa,  $^{*}P < 0.05$  ( $n = 6$ ). SO: Sham-operated group; PPVL: Partial portal vein ligation group; PPVL + NAC: Partial portal vein ligation group treated with NAC. Original magnification = 400.



**Figure 3** Western blot analysis. A: Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on eNOS expression,  $^{*}P < 0.05$  ( $n = 6$ ); B: Effects of PPVL and NAC administration on VEGF expression. SO: Sham-operated group; PPVL: Partial portal vein ligation group; PPVL + NAC: Partial portal vein ligation group treated with NAC,  $^{*}P < 0.01$  ( $n = 6$ ).

superoxide anion reacts with tyrosine residues and free tyrosine to produce NTT. In addition, the tyrosyl radical generated by ROS-mediated activation of tyrosine oxidizes nitric oxide, generating NTT<sup>22,23</sup>. The importance of NTT as a marker is based on the hypothesis that nitric oxide production will have been great enough to yield observable products such as NTT, as in the experimental model used in the present study<sup>23</sup>.

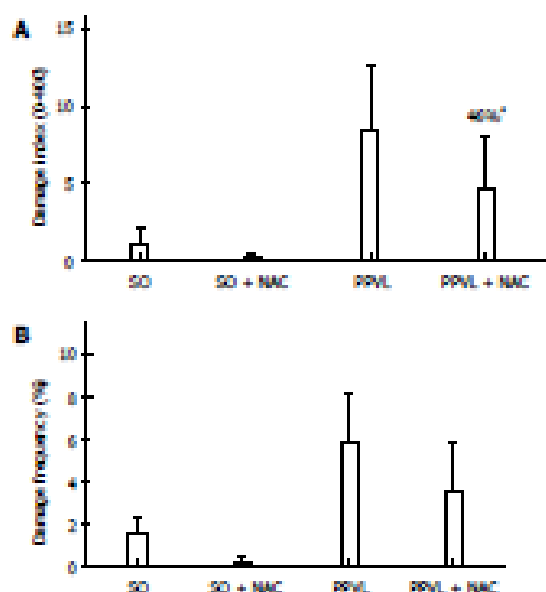
NAC treatment effectively reduced NTT immunoreactivity in PPVL animals as compared with controls (Figure 2C), which demonstrates not only the antioxidant effect of NAC as a free radical scavenger but also its effects on NO production. Fernando *et al.*<sup>23</sup> found that NAC administration was effective in reducing oxidative stress in PPVL animals as assessed by measurement of F2-isoprostanes and NO levels. In

the present study, reductions in NO bioavailability and free radical generation may have enabled reduction of the peroxynitrite levels observed in the gastric mucosa of experimental animals, and may explain the protection afforded by NAC therapy.

The collateral vasculature characteristic of hyperdynamic circulation is formed by dilatation of preexisting vessels and by the angiogenesis process, which is modulated by vascular growth factors such as VEGF<sup>24</sup>. This process is also an alternative pathway of nitric oxide production, mediated by VEGF activation<sup>24</sup>.

We assessed VEGF production in this experimental model by means of immunohistochemistry techniques and Western blot analysis. Rats in the PPVL group exhibited increased VEGF expression and immunoreactivity (Figures 2B and 3B) as compared

Licis F *et al.* N-acetylcysteine in portal hypertensive rats



**Figure 4** Comet assay. Damage index (A) and damage frequency (B). SO: Sham-operated group; SO + NAC: Sham-operated animals treated with NAC; PPVL: Partial portal vein ligation group; PPVL + NAC: Partial portal vein ligation group treated with NAC. \*Modulation of DNA damage index induced by NAC in PPVL animals.

with control animals. This demonstrates the presence of a stimulus for development of a collateral circulation in rats subjected to PPVL. NAC effectively reduced VEGF expression in the PPVL + NAC group, as demonstrated by both techniques employed.

Inhibition of VEGF receptor-2 has been shown to reduce hyperdynamic circulation and development of collaterals in rats with PH<sup>291</sup>, and NAC has been shown to effectively reduce VEGF and p-VEGFR2 expression in the mesenteric vasculature of cirrhotic rats<sup>291</sup>. The results of the present study corroborate these findings.

Oxidative stress damages membrane lipids, proteins, and DNA<sup>291</sup>. The present study demonstrated an increase in DNA damage index (Figure 4A) and damage frequency (Figure 4B), as assessed by the comet assay, in PPVL animals as compared with controls. NAC reduced DNA damage when administered to PPVL animals.

NAC has antigenotoxic effects and detoxifies free radicals, which cause cellular DNA damage and has been reported to reduce cyclophosphamide-induced genotoxicity as assessed by the micronucleus assay<sup>292</sup>. The present study demonstrated a DNA-protective effect of NAC as shown by the comet assay. A previous investigation conducted by our research group evaluated the actions of NAC in rats with CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis and found antigenotoxic effects associated with its antioxidant properties<sup>293</sup>.

In view of these findings, we conclude that NAC protects the gastric mucosa from the oxidative damage and hemodynamic changes related to nitric oxide

overproduction in rats subjected to PPVL. NAC was able to reduce nitric oxide and thus decrease portal system pressure. This effect, added to its antioxidant and antiangiogenic properties, led to a reduction of the hyperdynamic collateral circulation and had a protective action on the gastric mucosa.

## COMMENTS

### Background

Portal hypertension is the leading cause of bleeding and death in cirrhotic patients due to recurrent cases of upper gastrointestinal bleeding. This high rate of bleeding is due to the development of collateral circulation, which despite being a physiological mechanism for decompressing the system, leads to progressive dilatation of the vessels and their likely breakdown especially in stomach. Therefore, is very large number of studies trying to seek a way to reduce this vasodilation. In the case of this study, we elected the antioxidant N-acetylcysteine (NAC).

### Research frontiers

NAC is a drug already used in the clinic, easily accessed, inexpensive and well-tolerated. The importance of the NAC is due to its direct and indirect antioxidant action, so important in this disease.

### Innovations and breakthroughs

Previous work published by the group showed that NAC was effective in reducing oxidative stress and portal pressure in an experimental model of portal ligation of portal vein. In this present study, the authors aimed for better understanding the pathways involved in this effectiveness, pointing out the mechanisms used by this medicine to improve the gastropathy of portal hypertension.

### Applications

The elucidation of the mechanisms of NAC action is of paramount importance for understanding the pathophysiology of portal hypertension. Therefore, this is indispensable to study a future alternative treatment for this disease. NAC is effective in reducing gastric damage and oxidative stress in an experimental model of portal hypertensive gastropathy that demonstrates all the physiological alterations present in patients affected by this disease.

### Terminology

Gastropathy is the non-inflammatory macroscopic lesions present in patients with portal hypertension. The portal hypertension is characterized by progressive increase of pressure in the portal system, which leads to a risk of vascular rupture and upper gastrointestinal bleeding.

### Peer-review

This is a well-performed study in which the authors analyzed the protective effect of NAC on portal hypertensive gastropathy in rats. The results are interesting and suggest that this antioxidant is a potential therapeutic substance that could be used for preventing the upper gastrointestinal bleeding of portal hypertension patients.

## REFERENCES

- Militsas C, Garcia-Tsao G. Clinical pharmacology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39: 681-695 [PMID: 20951924 DOI: 10.1016/j.gtc.2010.08.015]
- Beech J, Banzigotti 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-S92 [PMID: 18204681 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.01.021]
- Hart K, Garcia-Tsao G. Treatment of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1166-1173 [PMID: 22468079 DOI: 10.3748/wjg.v18.i11.1166]
- Sikuler E, Grossman EJ. Interaction of flow and resistance in

- maintenance of portal hypertension in a rat model. *Am J Physiol* 1996; 250: G205-G212 [PMID: 3953799]
- 5 Triantafyllou M, Stanley AJ. Update on gastric varices. *World J Gastroenterol* 2014; 4: 168-175 [PMID: 24891929 DOI: 10.4253/wjga.v4.i5.168]
  - 6 West R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002; 35: 478-491 [PMID: 11826425 DOI: 10.1053/jhep.2002.31432]
  - 7 Iwakiri Y. The Molecular: Abnormal Vasculature in the Splanchnic and Systemic Circulation in Portal Hypertension. In: *Portal Hypertension - Causes and Complications*. InTech, 2012
  - 8 Abrahães JG, Iwakiri Y, Loureiro-Silva M, Haq Q, Sessa WC, Groszmann RJ. Mild increases in portal pressure upregulate vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase in the intestinal microcirculatory bed, leading to a hyperdynamic state. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 296: G910-G917 [PMID: 18407734 DOI: 10.1152/ajpgi.00306.2005]
  - 9 Harl N, West R, Groszmann RJ. Enhanced release of nitric oxide in response to changes in flow and shear stress in the superior mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998; 28: 1467-1473 [PMID: 9828208 DOI: 10.1002/hep.110280604]
  - 10 Fernandez M, Mujías M, Angermayr B, Garcia-Pagan JC, Rodés J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2005; 43: 98-103 [PMID: 15893841 DOI: 10.1016/j.jhep.2005.02.022]
  - 11 Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E, Van Vlierberghe H, Montier S, Chung KJ, Demetter F, Lameere N, De Vos M, Colle I. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an *in vivo* study. *Liver Int* 2008; 28: 809-820 [PMID: 18911473 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2008.01368.x]
  - 12 Kirshakulante TJ, Widlansky ME. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. *Cardiovasc Ther* 2010; 28: e20-e32 [PMID: 20707991 DOI: 10.1111/j.1755-5922.2010.00137.x]
  - 13 Montezano AC, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension-reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Clin J Cardiol* 2012; 28: 288-295 [PMID: 22445998 DOI: 10.1016/j.cjca.2012.01.017]
  - 14 Rodríguez-Villaverde A, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Potential role of antioxidants in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2007; 46: 193-197 [PMID: 17161463 DOI: 10.1016/j.jhep.2006.11.008]
  - 15 Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999; 31: 261-272 [PMID: 10517532 DOI: 10.1080/10715769908000041]
  - 16 Samuel V, Goldstein S, Dean OM, Bark M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4117-4129 [PMID: 23618697 DOI: 10.1016/j.bbag.2013.04.016]
  - 17 Goldin JB, Raymond MM. Pausina em suíde a dritiva dos animais. IBCPA, 1997
  - 18 Vercelline R, Tieppo J, Dias AS, Marrozi CA, Garcia E, Moura L, Picada JN, Marrozi NF. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Braz J Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102: 370-376 [PMID: 18041514 DOI: 10.1111/j.1742-7843.2007.00181.x]
  - 19 Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985; 248: G818-G825 [PMID: 4003545]
  - 20 Spill G, Hartmann A. The comet assay: A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols. Mammalian Systems. Second Edition*, 2006; 344: 275-286
  - 21 Picada JN, Flores DG, Zetter CO, Marrozi NF, Rosaler B, Henrique JA. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 114: 80-85 [PMID: 12702396 DOI: 10.1016/S0169-3283(03)00127-X]
  - 22 Association AVMA. Guidelines on Euthanasia. Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia, 2007
  - 23 Gaffey MJ, Mills SE, Swanson PE, Zerbe EJ, Shah AR, Wick MR. Immunoreactivity for HER-2/EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors, and malignant mesotheliomas. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 593-599 [PMID: 1596037 DOI: 10.1097/00000478-199206000-00007]
  - 24 San-Miguel B, Alvarez M, Calaberas JM, González-Gallago J, Tubón MJ. N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure. *Apoptosis* 2006; 11: 1945-1957 [PMID: 17021698 DOI: 10.1007/s10495-006-0090-0]
  - 25 Maurin JL, Molpeceres V, Garcia-Mediavilla MV, González F, Barrio JE, González-Gallago J. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Physiol Res* 2007; 42: 222-230 [PMID: 17349019 DOI: 10.1111/j.1600-0708.2006.00409.x]
  - 26 Tubón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Lallena A, Vellajo D, Álvarez M, Prieto J, González-Gallago J. Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Physiol Res* 2013; 55: 221-228 [PMID: 23679826 DOI: 10.1111/jpl.12063]
  - 27 Fernandez M. Molecular pathophysiology of portal hypertension. *Hepatology* 2013; 61: 1406-1415 [PMID: 25092403 DOI: 10.1002/hep.27343]
  - 28 Falli P, Palmieri L, D'Alfonso C, Giovannelli L, Gamberini S, Rosso AD, Pignone A, Stanfin N, Orsi S, Zilberli L, Mammì-Carinic M. Effect of N-acetyl-L-cysteine on peroxynitrite and superoxide anion production of lung alveolar macrophages in systemic sclerosis. *Nitric Oxide* 2002; 7: 277-282 [PMID: 12446178 DOI: 10.1016/S1089-8603(02)00120-6]
  - 29 Mills PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician* 2006; 68: 265-269 [PMID: 16211036]
  - 30 Marrozi AJ, Praga C, Alonso M, Collado PS, Zetter C, Marrozi C, Marrozi N, González-Gallago J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1939-1946 [PMID: 15476685 DOI: 10.1016/j.bcp.2004.07.016]
  - 31 Marques C, Maurin JL, Simonetto D, Marrozi CA, Tubón MJ, González-Gallago J, Marrozi NF. Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy. *Ann Hepatol* 2011; 10: 531-539 [PMID: 21911895]
  - 32 Lillo F, Marques C, Zetter C, Marrozi MI, Marrozi CA, Marrozi NF. Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats. *Ann Hepatol* 2014; 13: 370-377 [PMID: 24756013]
  - 33 Shah V, Lyford G, Goros G, Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 903-913 [PMID: 14988844 DOI: 10.1053/j.gastro.2003.11.046]
  - 34 Basconi I, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase membrane targeting. Evidence against involvement of a specific myristate receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 25016-25020 [PMID: 7523777]
  - 35 Hu LS, George J, Wang BH. Current concepts on the role of nitric oxide in portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 1707-1717 [PMID: 23551599 DOI: 10.3748/wjg.v19.i11.1707]
  - 36 Lee PC, Yang YY, Huang CS, Hsieh SL, Lee EC, Hsieh YC, Lee TY, Lin HC. Concomitant inhibition of oxidative stress and angiogenesis by chronic hydrogen-rich saline and N-acetylcysteine treatments improves systemic, splanchnic and hepatic hemodynamics of cirrhotic rats. *Hepato Res* 2015; 42: 578-588 [PMID: 24993897]
  - 37 Halliwell B. *Oxidative stress in biology and medicine*. New York: Oxford, 2007
  - 38 Eisenich JP, Butler J, van der Vliet A, Cross CE, Halliwell B. Nitric oxide rapidly scavenges hypoxanthine and tryptophan radicals. *Biochem J* 1995; 310 (Pt 3): 745-749 [PMID: 7575465]
  - 39 Shan PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 749-774 [PMID: 11826207 DOI: 10.1146/annurev.physiol.64.031501.15595.2]
  - 40 Facher F, Beckman JS, Lliandet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424 [PMID:

Licitis F *et al.* N-acetylcysteine in portal hypertensive rats

- 1723-7348 DOI: 10.1152/physrev.00029.2006]
41. **Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Barry D, Sanderson F, Smith R, Hamilton G, Moore K.** N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology* 1998; 28: 689-694 [PMID: 9731560 DOI: 10.1002/hep.510280314]
42. **Langer DA, Shah VH.** Nitric oxide and portal hypertension: interface of vasoreactivity and angiogenesis. *J Hepatol* 2006; 44: 209-216 [PMID: 16297469 DOI: 10.1016/j.jhep.2005.10.004]
43. **Schieber M, Chandel NS.** ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* 2014; 24: R453-R462 [PMID: 24845678 DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.034]
44. **Mullins DC, Hollstrom KE, Anderson KM, Johnson PM, Vinson MA.** Antioxidant-induced changes in oxidized DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5937-5941 [PMID: 11972027 DOI: 10.1073/pnas.092111999]

P- Reviewer: Haddad LJD, Schwab J, Tallis S  
S- Editor: Ma YJ L- Editor: A E- Editor: Liu XM





Published by Baishideng Publishing Group Inc  
8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA  
Telephone: +1-925-223-8242  
Fax: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wignet.com](mailto:bpgoffice@wignet.com)  
Help Desk: <http://www.wignet.com/esps/helpdesk.aspx>  
<http://www.wignet.com>



ISSN 1007-9327



### 4.3 EXPERIMENTO III

Apresentados no artigo III: *Synergistic antioxidant and anti-inflammatory action of N-acetylcysteine in portal hypertensive gastropathy in rats*, submetido na revista *Plos One*.

## PLOS ONE

## Synergistic antioxidant and anti-inflammatory action of N-acetylcysteine in portal hypertensive gastropathy in rats

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Synergistic antioxidant and anti-inflammatory action of N-acetylcysteine in portal hypertensive gastropathy in rats
<b>Short Title:</b>	Oxidative stress, inflammation and N-acetylcysteine
<b>Corresponding Author:</b>	Francieli Licks Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, BRAZIL
<b>Keywords:</b>	N-Acetylcysteine; Portal hypertensive gastropathy; Oxidative stress; Inflammation
<b>Abstract:</b>	<p><b>Introduction:</b> Portal hypertension (PH) is a syndrome associated with cirrhosis and characterized by a progressive increase in portal pressure, with consequent compensatory vascular dilation. Gastric vascular changes associated with oxidative and nitrosative stress characterize the clinical presentation of portal hypertensive gastropathy. In addition, the inflammatory process is considered an aggravating factor for severity, by contributing to the gastric tissue injury. <b>Aim:</b> To investigate the synergistic anti-inflammatory and antioxidant action of N-acetylcysteine (NAC) in the stomach of rats with portal hypertension. <b>Methods:</b> Eighteen male Wistar rats were used in this experimental protocol, divided into three groups (n=6/each): sham-operated (SO), partial portal vein ligation (PPVL), and PPVL + NAC. Treatment with NAC at a dose of 10 mg/kg (i.p.) was initiated on day 8 after surgery and continued for 7 days. We evaluated expression of iNOS, NQO-1, HSP-90, and SOD by Western blot, as well as NF-<math>\kappa</math>B and TNF-<math>\alpha</math> staining by immunohistochemistry, in the rat stomach. <b>Results:</b> The PPVL group exhibited increased expression of HSP-90, iNOS, SOD and NQO-1 when compared to controls. NAC reduced the expression of all studied proteins. Similarly, NF-<math>\kappa</math>B and TNF-<math>\alpha</math> staining was increased in PPVL animals vs. controls and reduced in PPVL + NAC vs. PPVL animals, respectively. <b>Conclusion:</b> These results suggest the effectiveness of NAC as a dual anti-inflammatory and antioxidant in animals with experimental portal hypertensive gastropathy induced by partial ligation of the portal vein.</p>
<b>Order of Authors:</b>	<p>Francieli Licks</p> <p>Renata Minuzzo Hartmann</p> <p>Elizângela Schemitt</p> <p>Josiele Reskopf Colares</p> <p>Henrique Filmann</p> <p>Norma Pessa Mattoni</p>

## **Synergistic antioxidant and anti-inflammatory action of N-acetylcysteine in portal hypertensive gastropathy in rats**

Francieli Licks MSc<sup>a</sup>, Renata Minuzzo Hartmann MSc<sup>b</sup>, Elizângela Schemitt MSc<sup>b</sup>, Josieli Raskopf Colares<sup>d</sup>, Henrique Fillmann PhD<sup>c</sup>, Norma Possa Marroni PhD<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas : Fisiologia

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas

<sup>c</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

<sup>d</sup> Universidade Luterana do Brasil, Programa de Pós Graduação em BioSaúde

Francieli Licks  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Paulo Gama, 110  
Porto Alegre, RS 90040-060, Brazil  
francieli.licks@gmail.com

Renata Minuzzo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Paulo Gama, 110  
Porto Alegre, RS 90040-060, Brazil  
re\_minuzzo@yahoo.com.br

Elizângela Schemitt  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Paulo Gama, 110  
Porto Alegre, RS 90040-060, Brazil  
elizschemitt@yahoo.com.br

Josieli Raskopf Colares  
Universidade Luterana do Brasil  
Avenida Farroupilha, 8001  
Canoas, RS 92425-900, Brazil  
jozy.ma@hotmail.com

Henrique Sarubbi Fillmann  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Av. Ipiranga, 6681  
Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil  
henrique@fillmann.com.br

Norma Possa Marroni  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Paulo Gama, 110  
Porto Alegre, RS 90040-060, Brazil  
nmarroni@terra.com.br

Corresponding author: Francieli Licks



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Paulo Gama, 110  
Porto Alegre, RS 90040-060  
Brazil  
francielli.licks@gmail.com.br

### Acknowledgments

This study was conducted with the financial support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE Project No. 11-0293) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the HCPA Hepatology and Experimental Gastroenterology Laboratory, and the Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) Oxidative Stress and Antioxidants Laboratory. We thank the staff at the aforementioned laboratories for their contributions throughout the course of this investigation.

### ABSTRACT

**Introduction:** Portal hypertension (PH) is a syndrome associated with cirrhosis and characterized by a progressive increase in portal pressure, with consequent compensatory vascular dilation. Gastric vascular changes associated with oxidative and nitrosative stress characterize the clinical presentation of portal hypertensive gastropathy. In addition, the inflammatory process is considered an aggravating factor for severity, by contributing to the gastric tissue injury. **Aim:** To investigate the synergistic anti-inflammatory and antioxidant action of N-acetylcysteine (NAC) in the stomach of rats with portal hypertension. **Methods:** Eighteen male Wistar rats were used in this experimental protocol, divided into three groups (n=6/each): sham-operated (SO), partial portal vein ligation (PPVL), and PPVL + NAC. Treatment with NAC at a dose of 10 mg/kg (i.p.) was initiated on day 8 after surgery and continued for 7 days. We evaluated expression of iNOS, NQO-1, HSP-90, and SOD by Western blot, as well as NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  staining by immunohistochemistry, in the rat stomach. **Results:** The PPVL group exhibited increased expression of HSP-90, iNOS, SOD and NQO-1 when compared to controls. NAC reduced the expression of all studied proteins. Similarly, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  staining was increased in PPVL animals vs. controls and reduced in PPVL + NAC vs. PPVL animals, respectively. **Conclusion:** These results suggest the effectiveness of NAC as a dual anti-inflammatory and antioxidant in animals with experimental portal hypertensive gastropathy induced by partial ligation of the portal vein.

**Key Words:** N-Acetylcysteine, Portal hypertensive gastropathy, Oxidative stress, Inflammation

## INTRODUCTION

The portal system is responsible for leading blood from the intra-abdominal portion of the gastrointestinal tract, pancreas, spleen, and gallbladder to the liver sinusoids via the terminal branches of the portal vein. This hemodynamic system is maintained with a homeostatic pressure of 5 to 10 mmHg, with these values varying depending on the measurement method used (1).

Pre-hepatic abnormalities (such as splenic vein thrombosis), intrahepatic abnormalities (such as cirrhosis), and post-hepatic conditions (such as Budd-Chiari syndrome) may all influence blood pressure within the portal system. The only shared characteristic of the aforementioned examples is the emergence of an anatomical barrier to blood flow. This obstacle triggers a compensatory mechanism to reduce blood pressure, promoting the development of a hyperdynamic collateral circulation. This condition, characterized by a progressive increase of pressure in the portal system, is called portal hypertension (PH) (2).

The direction of blood flow between the portal and systemic circulation, previously ineffective due to obstruction, is made effective by the development of collateral circulation. However, the resulting bypass of blood flow from the site of obstruction directly into the systemic circulation triggers serious complications, such as ascites, hepatic encephalopathy, and gastrointestinal bleeding, with the latter accounting for the high mortality rate of 50% among patients with PH (3).

Gastrointestinal bleeding is frequent in these patients, and is due to the progressive increase of pressure in the portal system. The portosystemic collaterals comprise the collateral circulation, with the main characteristic sites being the esophagus, stomach, rectum, anterior abdominal wall, and left renal vein (1).

Microcirculatory alterations in the gastric mucosa as a result of the characteristic vasodilation of HP were described by McCormack *et al.* in 1985 (4). Several different terms have been used to describe these changes, such as inflammatory gastritis, gastric mucosal vasculopathy, portal-hypertensive mucosa, and portal hypertensive gastropathy (5).

Portal hypertensive gastropathy (PHG) is characterized by vasodilation secondary to obstruction of gastric blood flow, and nitric oxide (NO) is the main mediator in this vascular activation pathway (6). NO is an endothelium-derived relaxing factor produced from L-arginine and molecular oxygen, in a process catalyzed by enzymes in the nitric oxide synthase (NOS) family. The three major NOS isoforms, neuronal NOS (nNOS, NOS1), inducible NOS (iNOS, NOS2), and endothelial NOS (eNOS, NOS3), are described in the literature, with well-established roles. The NOS1 is expressed predominantly in the central and peripheral neurons and their functions include synaptic plasticity, regulating blood pressure and smooth muscle relaxation. NOS2 can be expressed in various cell types, and plays important roles in inflammatory diseases and septic shock. NOS3 is expressed in endothelial cells and acts on endothelial smooth muscle relaxation (7). All three isoforms have been associated with portal hypertension; however, the most influential isoforms in this syndrome are NOS2 and NOS3 (8).

NOS3 is closely related to several factors and proteins that have positive and negative impacts on its production. Proteins that positively influence production of this enzyme include the positive regulator molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90) (9).

Shear stress and vascular endothelial growth factor (VEGF) also act on the pathway that stimulates production of NOS3, and both have been studied previously in investigations conducted by our research group (10,11).

NOS2, compared to eNOS, produces a relatively high level of nitric oxide. However, unlike the former, this isoform is expressed in response to stimulation from lipopolysaccharides or inflammatory cytokines, and its expression is modulated by transcriptional mechanisms. Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) is the primary mediator for the induction of iNOS, which, in turn, is activated mainly by tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and oxidative stress (8).

In portal hypertension, overproduction of nitric oxide via NOS2 and NOS3 determines its reaction with the superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), leading to formation of peroxynitrite (ONOO $^-$ ). This, in turn, is a highly reactive species that can contribute to cellular damage, thus aggravating the overall clinical picture (14).

The inflammation characteristic of portal hypertension affects gastric regeneration and defense, thus increasing the risk of bleeding (12). Currently, one hypothetical treatment strategy involves direct reduction of proinflammatory chemokines and cytokines, which contribute to the progression of PH (15).

Thus, a treatment with both antioxidant and anti-inflammatory action would represent a promising candidate for minimizing the consequences of PHG. Previous work published by our research group has demonstrated the antioxidant properties of N-acetylcysteine (NAC), a molecule used extensively in clinical practice, in an experimental model of PH (11). The aim of this study was to evaluate the synergistic action of NAC as an antioxidant and anti-inflammatory in PHG.

## MATERIAL AND METHODS

### Ethics

All procedures were carried out in accordance with current Brazilian legislation for the practice of scientific research using animals (Law 11.794 of October 8, 2008, 2013 Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals for Scientific and Educational Purposes, and 2013 CONCEA Guidelines for the Practice of Euthanasia).

### Animal groups and experimental protocols

The animals used in this study were obtained through the Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA) vivarium, in accordance with institutional specifications, from registered HCPA suppliers. Throughout the experiment, animals were kept in plastic bin-type cages (47 x 34 x 18 cm) lined with wood shavings, under a 12-hour light/dark cycle, at a temperature of  $22 \pm 4$  °C. They had access to water *ad libitum* and were fed commercially available rodent chow (Purina® - Nutripal, Porto Alegre, RS, Brazil), approximately 16 g/day.

On the first day of the experiment, animals were randomly divided into three groups (n=6/each): SO (Sham-operated), PPVL (partial portal vein ligation), and PPVL+NAC. All animals were weighed ( $\approx$ 250g) and anesthetized with ketamine (100 mg/kg ip) and xylazine (10 mg/kg ip). Once a proper plane of anesthesia had been achieved, a midline laparotomy was performed and the bowel gently retracted with a gauze pad soaked in saline. In group SO, only manipulation of the portal vein was performed, while in the other groups, the vein was ligated for experimental induction of PH. Briefly, the portal vein was isolated with 3-0 silk thread, partially blocked using a 20G needle placed in front of the vessel, and tied off. After ligation, the needle was removed, thus leaving the vein partially obstructed. Bowel loops were gently replaced into the abdomen, 10 ml of saline solution infused the abdominal cavity, and the peritoneum closed with running sutures. The experimental model used in this study was first described by Sikuler *et al.* in 1985, and induces pre-hepatic portal hypertension (13).

After the surgical procedures, animals were kept in individual cages. Metamizole was administered for postoperative analgesia, with the first dose given via intramuscular injection (200 mg/kg) and subsequent doses given orally (500mg/kg every 8 hours for 72 hours).

Seven days were allowed to elapse for the establishment of the portal hypertensive gastropathy before starting treatment. NAC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; CAS registry number 616-91-1) was administered intraperitoneally at a dose of 10 mg/kg, in agreement with previous studies (11,14). The drug was dissolved in 0.6 ml of saline (0.9% NaCl), the same volume administered to groups which received vehicle only (SO and PPVL). Treatment was continued for 7 days, thus completing the full 15-day experimental period.

#### **Euthanasia and collection of tissue samples**

On day 15, animals were again weighed and anesthetized with ketamine (100 mg/kg ip) and xylazine (10 mg/kg ip). Once adequate anesthesia had been achieved, a midline laparotomy was performed and the stomach resected for analysis. One portion of the stomach was frozen at -80 °C, and a second fragment fixed in 10% buffered formalin for 24h. Then, 3-mm sections were cut from the paraffin block using a rotary microtome.

#### **Western blot**

Western blot analysis was performed using cytosolic extract prepared from stomach homogenates. The protein concentration of each sample was measured by the Bradford method (Bradford, 1976). Then, lysate proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. The membranes were blocked by submerging in Tris-buffered saline and 0.05% Tween (TTBS) with 5% nonfat dry milk for 1 hour at room temperature and probed overnight at 4°C. The following antibodies were used: mouse polyclonal antibody (NOS2 (sc-7271), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); mouse monoclonal antibody (HSP90 (sc-101494), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); goat monoclonal antibody (NQO1 (sc-16464), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); goat monoclonal antibody (SOD (sc-8637), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), at 1:200 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk; and anti- $\beta$ -actin (42-kDA) antibody (Sigma Aldrich, StLouis, MO, USA) at 1:1,000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. After overnight incubation, the membranes were washed with TTBS and incubated for 1 h at room temperature with secondary goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005, donkey anti-goat antibody (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:4,000). Protein detection was performed via chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England). The density of the specific bands was quantified with imaging densitometry software (Scion Image, Maryland, MA) (16).

#### **Immunohistochemistry**

Expression of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in stomach tissue was analyzed using immunohistochemical techniques. Buffer at 100 °C was used for antigen retrieval and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in absolute methanol. Slides were then incubated with rabbit polyclonal antibody (NF- $\kappa$ B [sc-9072], 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and goat monoclonal antibody (TNF- $\alpha$  [sc-1351], 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) overnight at 4 °C,

followed by washing with buffer and incubation with secondary goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004) for 30 minutes at room temperature. The slides were analyzed under a microscope equipped with a digital camera, and images captured using Image-Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Quantification of staining for both markers was performed by digital image analysis in Adobe Photoshop® CS3 Extended 10.0, by counting the number of pixels stained. The level of expression was determined by multiplying the average density of the image by the percentage of positively stained areas (those colored brown) (17).

#### Statistical analysis

Statistical significance was calculated using GraphPad InStat version 3.0 for Windows. Analysis of variance (ANOVA) and the Student-Newman-Keuls test were used for multiple analyses, with the level of significance set at 5% ( $P < 0.05$ ). All data are presented as mean  $\pm$  SE.

## RESULTS

### Western blotting analysis

Analysis of HSP90 protein expression revealed a significant increase in the PPVL group as compared to controls ( $p < 0.01$ ). NAC effectively reduced these values in the PPVL + NAC group ( $p < 0.01$ ) (Figure 1a).

Similar findings were observed on analysis of iNOS expression, which was significantly increased in the PPVL group ( $p < 0.01$ ) and decreased in the PPVL + NAC group ( $p < 0.05$ ) (Figure 1b).

SOD was also overexpressed in the PPVL group when compared to the SO group ( $p < 0.05$ ). Again, NAC was able to reduce these values substantially in the treated group, down to control levels ( $p < 0.05$ ) (Figure 1c).

Analysis of NQO1 protein expression also revealed significantly elevated expression in the PPVL group ( $p < 0.05$ ) when compared to controls. NAC restored these values, reducing them significantly in the PPVL + NAC group ( $p < 0.05$ ) (Figure 1d).

### Immunohistochemistry

Animals in the PPVL group showed a significant increase in positive staining for NF- $\kappa$ B as compared with controls ( $p < 0.01$ ). NAC was effective in reducing this immunoreactivity in the PPVL + NAC group ( $p < 0.01$ ) (Figure 2a).

The same pattern of expression was observed on analysis of TNF- $\alpha$ . In the PPVL group, there was intense staining as compared with the SO group ( $p < 0.01$ ); in the PPVL + NAC group, this immunoreactivity was reduced ( $p < 0.01$ ) (Figure 2b).

## DISCUSSION

Portal hypertension, often described as a complication of chronic liver disease, is characterized by increased blood pressure in the portal system, splanchnic vasodilation, and subsequent formation of portosystemic collaterals (18).

The stomach is one of the main sites affected by this marked increase in vascular diameter; accordingly, gastropathy is one of the most frequent complications of portal hypertension. In practice, gastric lesions are typically located at the fundus and superior portion of the body of the stomach (19), and characterized by a mosaic-like pattern, with or without cherry-red spots (20). Still, the release of inflammatory mediators and consequent gastric inflammation appears to contribute to the development and worsening of gastropathy of portal hypertension (21).

The involvement of nitric oxide in the development of a hyperdynamic collateral circulation was originally proposed in 1991 by Vallance and Moncada (22). This hypothesis has since been confirmed by several studies that demonstrated NO as the

main mediator of vascular abnormalities in portal hypertension (23,24). In previous investigations, our research group found increased expression of two nitric oxide synthase isoforms predominantly involved in the activation of NO synthesis (eNOS and iNOS), using an animal model of portal hypertension (10,25).

An increase in eNOS expression is already detectable in the early stages of portal hypertension induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) (25), and eNOS appears to be the major enzymatic pathway for NO synthesis (26). Agonists in the eNOS activation pathway include shear stress, VEGF, and HSP90, among others. Furthermore, inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  appear to influence nitric oxide production by eNOS (9).

Increased pressure in the portal system contributes to shear stress and subsequent release of nitric oxide in the splanchnic vascular bed. Activation of eNOS by shear stress leads to its phosphorylation at serine and tyrosine residues, a mechanism capable of inducing sustained production of NO over a prolonged period (7).

Another modulator of nitric oxide upregulation is VEGF, which is activated by increased portal pressure. Through its angiogenic activity, VEGF ultimately contributes to increased blood flow in the splanchnic territory and to local vasodilation (26).

In a previous study, our group found that animals subjected to the PPVL experimental model of PH showed a significant increase in vascular dilation and VEGF expression and immunoreactivity in the eNOS activation pathway; NAC was able to reduce both in the gastric mucosa of the evaluated animals (11). In the present study, animals subjected to the same experimental model had increased expression of HSP90 when compared to controls (Figure 1a), which demonstrates the influence of this chaperone in the eNOS activation pathway and confirms previous results published by Ai *et al.*, in which HSP90 was overexpressed in the endothelium of mesenteric vessels in PPVL animals (27).

HSP90 promotes specific signaling pathways that facilitate folding and stabilization of cellular proteins, and, in portal hypertension, it exerts an agonist effect on nitric oxide production and vasodilation via eNOS (28). Clearly, this chaperone plays an important role in hyperdynamic circulation.

NAC was able to reduce the expression of HSP90 in the model tested herein. Therefore, the chosen treatment appears to fully modulate the studied pathway, reducing levels not only of VEGF but also of HSP90, and thereby contributing to a reduction in vasodilation mediated by eNOS (Figure 1a).

In portal hypertension, iNOS is also upregulated. The inducible form of nitric oxide synthase is activated during disease progression, and may even be regulated by NF- $\kappa$ B. Stimulation of iNOS expression occurs along with activation of the innate and adaptive immune systems, infiltration by polymorphonuclear leukocytes, and recruitment of lymphocytes. The latter produce large amounts of nitric oxide and cytokines that modulate the inflammatory process, such as TNF- $\alpha$  (8).

Our results showed higher expression of iNOS in PPVL animals when assessed by the Western blot technique (Figure 1b). Therefore, this enzyme, which plays important roles both in physiological situations (such as tissue repair and immune defense) and in pathological conditions (infection and inflammation), is overexpressed in the gastric mucosa of animals with PH. Our results suggest that gastric inflammation is clearly established in this experimental model, which is consistent with the literature (25).

NAC has modulatory activity at different stages of the inflammatory and phagocytic process, stimulating immune functions and reducing levels of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, it inhibits production of nitric oxide via iNOS

(30). In this study, animals treated with NAC exhibited reductions in iNOS expression in the stomach, and, therefore, an attenuation of gastric inflammation (Figure 1b). The same phenomenon was reported in a previous study using an animal model of portal hypertension induced by dimethylnitrosamines (29).

This finding was reaffirmed in our analysis of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  immunoreactivity in gastric tissue: both were significantly increased in PPVL animals as compared with controls (Figures 2a and 2b).

NF- $\kappa$ B is currently considered a typical pro-inflammatory signaling molecule, due to its action on the expression of proinflammatory genes, chemokines, cytokines, and adhesion molecules (31). In cytoplasm, this factor is bound to its inhibitory protein, I $\kappa$ B; only after phosphorylation and degradation by specific protein kinases, such as the I $\kappa$ B kinase complex, does translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus become possible (33). The stimulus for NF- $\kappa$ B translocation occurs via neurotransmitters such as glutamate, viral and bacterial products, reaction products (via iNOS), increased intracellular calcium levels, and oxidative stress (32).

TNF- $\alpha$ , in turn, is a cytokine with an important role in activation of NF- $\kappa$ B. It participates in a wide spectrum of biological activities, including inflammation, apoptosis, and cell growth and differentiation. By extracellular stimuli, TNF causes phosphorylation of I $\kappa$ B and subsequent release of NF- $\kappa$ B, which can then act on target genes in the cell nucleus (32).

In the literature, the anti-inflammatory properties of NAC have been associated with its ability to modulate immune response and its actions on leukotriene and prostaglandin metabolism, among other mechanisms (34). All of these effects are related to the nature of NAC as a donor source of -SH groups, inducing synthesis of glutathione (GSH), which increases cellular protection against oxidative stress and inflammatory processes. NAC also acts to reduce reactive oxygen species produced by leukocytes (35).

NAC inhibits the activation of NF- $\kappa$ B by suppressing the 19S regulatory subunit (35), and, according to Oka *et al.*, inhibits the I $\kappa$ B kinase complex (IKK), which is responsible for phosphorylation of NF- $\kappa$ B (36). NAC also blocks TNF- $\alpha$  by reducing its affinity for the TNF receptor, through modification and reduction of protein disulfide bonds (30).

It is well known that not only the inflammatory process but also oxidative stress is an aggravating factor in chronic liver disease (30). Prolonged nitric oxide synthesis at high levels may induce oxidative stress due to production of peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), a powerful oxidant. This compound, generated by the NO and peroxynitrite reaction, can cause oxidative and nitrosative damage to proteins, lipids, and DNA (37). The presence of a high concentration of peroxynitrite in the gastric mucosa of animals subjected to the PPVL model of PH was previously demonstrated by immunohistochemistry (11). Yet, in the same experimental model, an increase in the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and NO levels and a reduction in activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) have been demonstrated, results that suggest increased oxidative stress (38).

In the present study, we evaluated the possibility that NAC would act synergistically as a dual antioxidant and anti-inflammatory. To determine its antioxidant role, we used the Western blot technique to assess expression of SOD and NADPH quinone oxidoreductase-1 (NQO1).

SOD is an antioxidant enzyme responsible for catalyzing the dismutation of superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) into hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). Increased levels of this enzyme are indicative of increased  $O_2^{\cdot-}$  production and, hence, of oxidative stress (30,39). In the

present study, expression of this enzyme was significantly increased in PPVL animals as compared to controls, and NAC was able to reduce such overexpression (Figure 1c).

The reactive oxygen species can be removed from tissue by endogenous antioxidants such as thiols, components which are found, e.g., in GSH (40). As a precursor of this molecule, NAC acts as an antioxidant, and can thus be beneficial in disorders aggravated by oxidative stress. In this study, NAC had a clear antioxidant effect, as demonstrated on analysis of SOD expression (Figure 1c) in the PPVL + NAC group. Levels of this enzyme returned to near-control values, demonstrating a reduction in oxidative stress and, consequently, in expression of the SOD enzyme.

Another antioxidant molecule, which is less effective than SOD but acts as a direct scavenger of the superoxide anion, NQO1 (39). The *NQO1* gene encodes enzymes responsible for cell protection, which catalyze the reduction of electrons and prevent the formation of reactive oxygen species (41). Increased expression of NQO1 was demonstrated in PPVL animals (Figure 1d) when compared to controls. This finding is probably related to the cellular response to oxidative stress caused by inflammation (41), and NAC showed a synergistic antioxidant and anti-inflammatory activity in reducing expression of this marker in the gastric mucosa of PPVL + NAC animals (Figure 1d).

From the findings of this study, we conclude that the experimental model of PPVL successfully induces portal hypertension with subsequent inflammation and oxidative stress in the gastric mucosa. Furthermore, we suggest that a synergistic antioxidant and anti-inflammatory effect of NAC was able to attenuate the damage caused by these processes, contributing to the integrity of gastric tissue and mitigating the injuries caused by this experimental model.



## FIGURES

FIGURE 1a: Western blot for HSP90

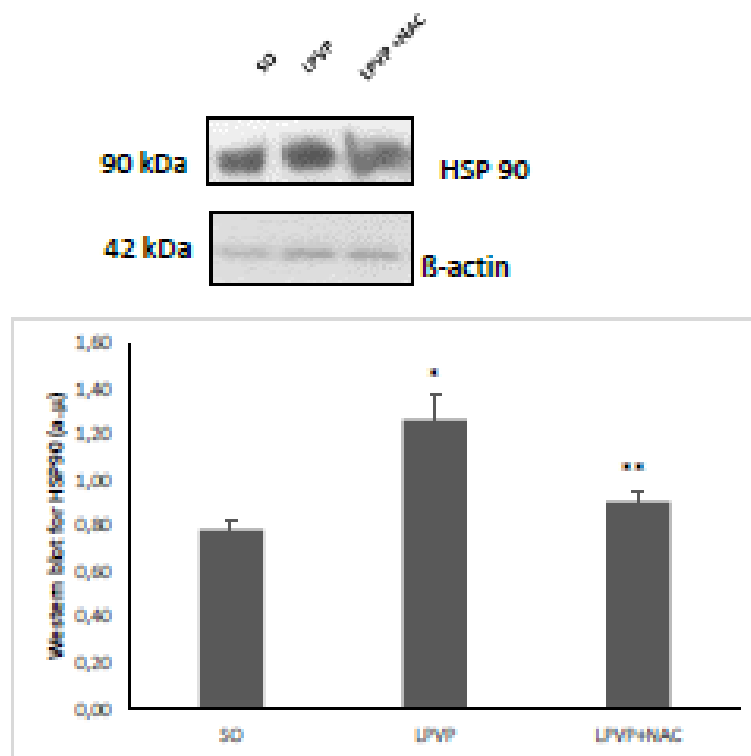


FIGURE 1b: Western blot for iNOS



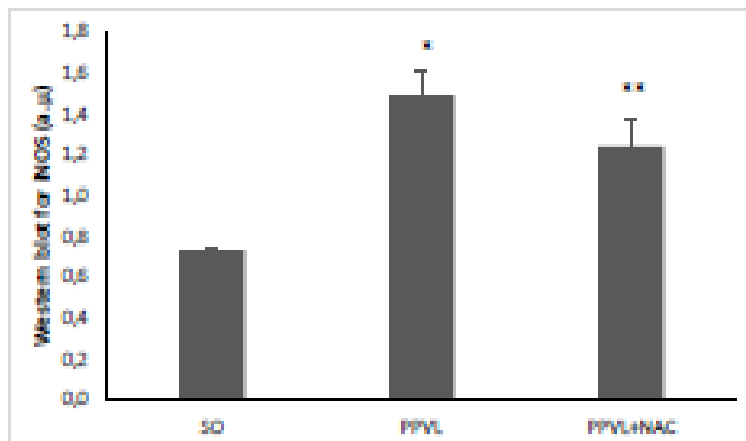


FIGURE 1c: Western blot for SOD

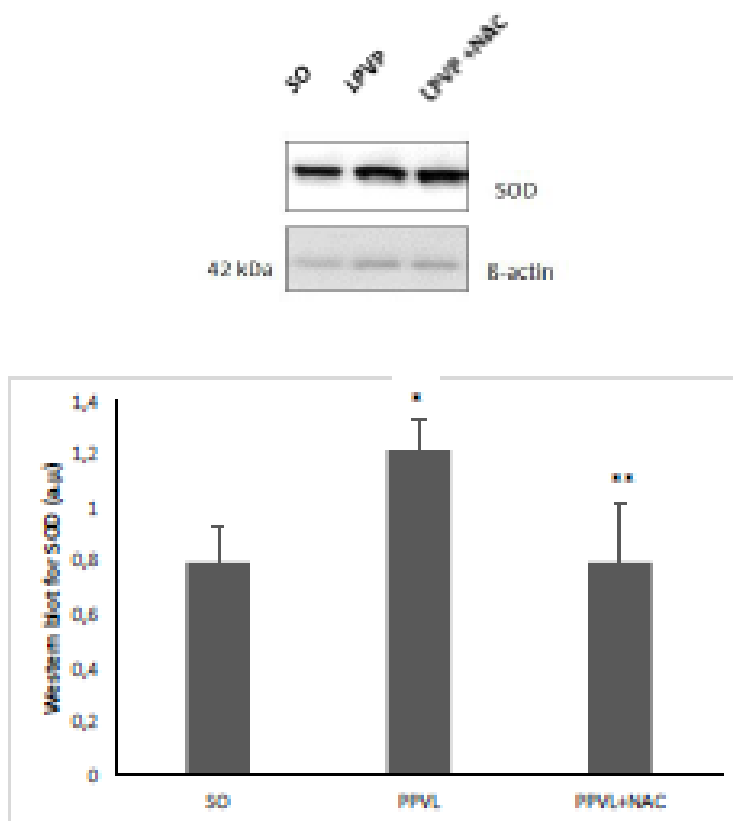
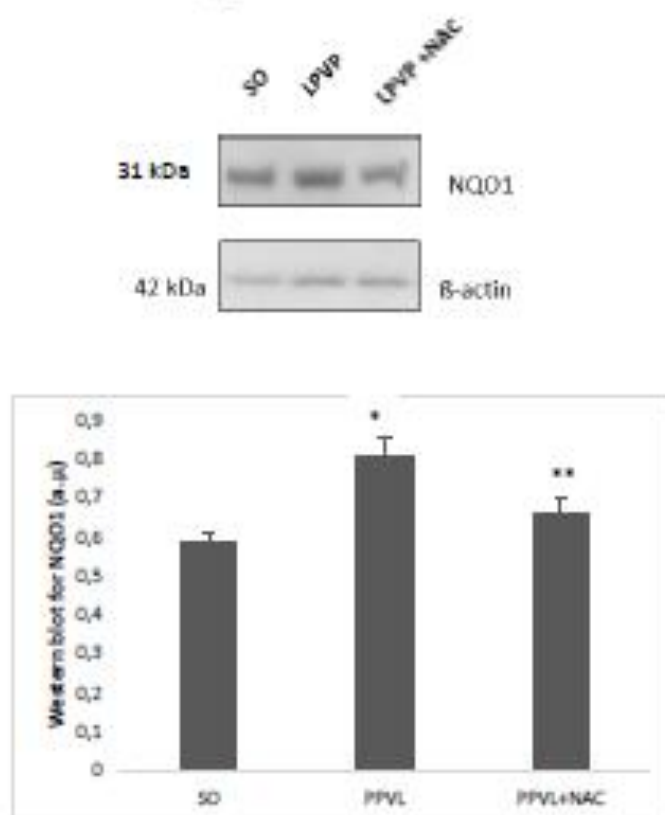
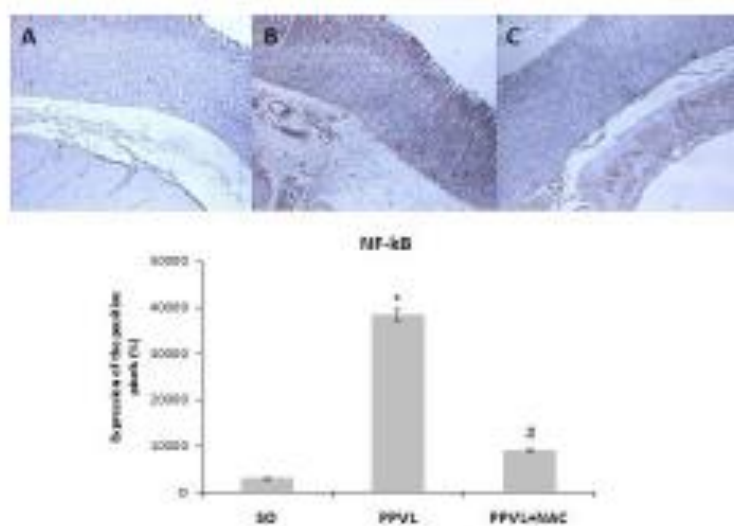
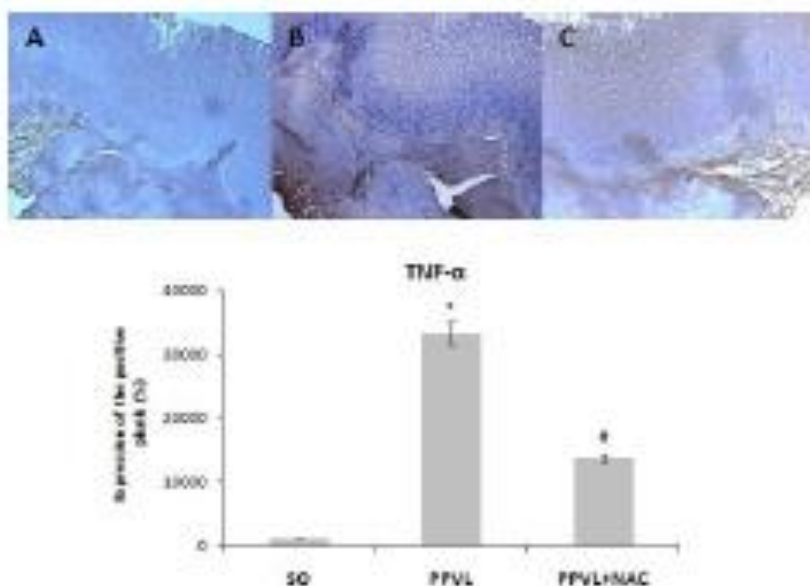


FIGURE 1d: Western blot for NQO1

FIGURE 2a: Immunohistochemical staining for NF- $\kappa$ B

**FIGURE 2b: Immunohistochemical staining for TNF- $\alpha$**



## LEGENDS

### FIGURE 1a: Western blot for HSP90

Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on HSP90, quantified by the Western blot technique. SO, sham-operated group, PPVL, partial portal vein ligation group, PPVL + NAC, partial portal vein ligation group plus NAC treatment. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.01$  ( $n = 6$ ).

### FIGURE 1b: Western blot for iNOS

Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on iNOS, quantified by the Western blot technique. SO, sham-operated group, PPVL, partial portal vein ligation group, PPVL + NAC, partial portal vein ligation group plus NAC treatment. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$  ( $n = 6$ ).

### FIGURE 1c: Western blot for SOD

Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on SOD, quantified by the Western blot technique. SO, sham-operated group, PPVL, partial portal vein ligation group, PPVL + NAC, partial portal vein ligation group plus NAC treatment. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.05$  ( $n = 6$ ).

### FIGURE 1d: Western blot for NQO1

Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on NQO1, quantified by the Western blot technique. SO, sham-operated group, PPVL, partial portal vein ligation group, PPVL + NAC, partial portal vein ligation group plus NAC treatment. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.05$  ( $n = 6$ ).

### FIGURE 2a: Immunohistochemical staining for NF- $\kappa$ B

Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on NF- $\kappa$ B expression. SO, sham-operated group, PPVL, partial portal vein ligation group, PPVL + NAC, partial portal vein ligation group plus NAC treatment. \* $P < 0.001$  ( $n = 6$ ).

### FIGURE 2b: Immunohistochemical staining for TNF- $\alpha$

Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on TNF- $\alpha$  expression. SO, sham-operated group, PPVL, partial portal vein ligation group, PPVL + NAC, partial portal vein ligation group plus NAC treatment. \* $P < 0.001$  ( $n = 6$ ).

## REFERENCES

- 1- Martinelli, A. Hipertensão Portal. *Medicina* 2004, 37: 253-261.
- 2- Khurram Bari, Guadalupe Garcia-Tsao. Treatment of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2012, March 21; 18(11): 1166-1175.
- 3- Nicolas Goossens, Shigeki Nakagawa, Yujin Hoshida. Molecular prognostic prediction in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2015, Sep 28; 21(36): 10262–10273.
- 4- McCormack TT, Sims J, Eyre-Brook I, Kennedy H, Goepel J, Johnson AG, Triger DR. Gastric lesions in portal hypertension: inflammatory gastritis or congestive gastropathy? *Gut* 1985, 26:1226–1232.
- 5- Parit Mekaroonkamol, Robert Cohen, Saurabh Chawla. Portal hypertensive enteropathy. *World J Hepatol*. 2015, Feb 27; 7(2): 127–138.
- 6- Gracia-Sancho J, Maeso-Díaz R, Bosch J. Pathophysiology and a Rational Basis of Therapy. *Dig Dis*. 2015;33(4):508-14.
- 7- Ulrich Förstermann, William C. Sessa. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr; 33(7): 829–837.
- 8- Liang Shuo Hu, Jacob George, and Jian Hua Wang. Current concepts on the role of nitric oxide in portal hypertension. *World J Gastroenterol*. 2013 Mar 21; 19(11): 1707–1717.
- 9- Maria Martell, Mar Coll, Nahia Ezkurdia, Inma Raurell, Joan Genescà. Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. *World J Hepatol*. 2010 June 27; 2(6): 208-220
- 10- Camila Marques, Francielli Licks, Ingrid Zattoni, Beatriz Borges, Luiz Eduardo Rizzo de Souza, Cláudio Augusto Marroni, Norma Possa Marroni. Antioxidant properties of glutamine and its role in VEGF-Akt pathways in portal hypertension gastropathy. *World J Gastroenterol*. 2013 July 28; 19(28): 4464–4474.
- 11- Francielli Licks, Renata Mizuzo Hartmann, Camila Marques, Elizângela Schemitt, Josieli Raskopf Colares, Mariana do Couto Soares, Juliana Reys, Camila Fisher, Juliana da Silva, Norma Possa Marroni. N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol*. 2015 November 21; 21(43): 12351–12360.
- 12- Nathalie H. Urrunaga, Don C. Rockey. Portal Hypertensive Gastropathy and Colopathy. *Clin Liver Dis*. 2014 May; 18(2): 389–406.
- 13- Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985;248(6 Pt 1):G618-25.
- 14- 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;102(4):370-6.

- 15- Dmitry Victorovich Garbuzenko. Contemporary concepts of the medical therapy of portal hypertension under liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2015 May 28; 21(20): 6117-6126.
- 16- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 1979;76:4350-4354. [PMC free article]
- 17- Gaffey MJ, Mills SE, Swanson PE, Zarbo RJ, Shah AR, Wick MR. Immunoreactivity for BER-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors, and malignant mesotheliomas. *Am J Surg Pathol* 1992;16(6):593-9
- 18-Tilman Sauerbruch, Jonel Trebicka. Future therapy of portal hypertension in liver cirrhosis – a guess. *Prime Rep*. 2014; 6: 95.
- 19- Cristina Ripoll, Guadalupe Garcia-Tsao. Management of Gastropathy and Gastric Vascular Ectasia in Portal Hypertension. *Clin Liver Dis*. Author manuscript; available in PMC 2011 May 1.
- 20- Cubillas R, Rockey DC. Portal hypertensive gastropathy: a review. *Liver Int*. 2010 Sep;30(8):1094-102.
- 21- María-Angeles Aller, Jorge-Luis Arias, Arturo Cruz, Jaime Arias. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model*. 2007; 4: 44.
- 22- Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet*. 1991;337:776-778.
- 23- Maria Martell, Mar Coll, Nahia Ezkurdia, Inma Raurell, Joan Genescà. Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. *World J Hepatol*. 2010 Jun 27; 2(6): 208-220.
- 24- Massimo Bolognesi, Marco Di Pascoli, Alberto Verardo, Angelo Gatta. Splanchnic vasodilation and hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 14; 20(10): 2555-2563.
- 25- Andrea J. Moreira , Christina Fraga, Maria Alonso , Pilar S. Collado, Claudio Zetler, Claudio Marroni, Norma Marroni, Javier González-Gallego. Quercetin prevents oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochemical Pharmacology* 68 (2004) 1939-1946
- 25- M Bolognesi, D Sacerdoti, M Di Pascoli, P Angeli, S Quarta, A Sticca, P Pontisso, C Merkel, A Gatta. Haeme oxygenase mediates hyporeactivity to phenylephrine in the mesenteric vessels of cirrhotic rats with ascites. *Gut*. 2005 Nov; 54(11): 1630-1636.
- 26- 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; 25: 370-378
- 26- Yasuko Iwakiri. Endothelial dysfunction in the regulation of portal hypertension. *Liver Int*. 2012 Feb; 32(2): 199-213.

- 27- Jian-Hua Ai, Zhen Yang, Fa-Zu Qiu, Tong Zhu. Heat shock protein 90 is responsible for hyperdynamic circulation in portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol*. 2003 Nov 15; 9(11): 2544–2547.
- 28- Lukas Moleda, Lars Jurzik, Matthias Froh, Erwin Gäbele, Claus Hellerbrand, Rainer H Straub, Jürgen Schölmerich, Reiner Wiest. Role of HSP-90 for increased nNOS-mediated vasodilation in mesenteric arteries in portal hypertension. *World J Gastroenterol*. 2010 Apr 21; 16(15): 1837–1844.
- 29- Zhuang RX, Wang FG, Zhou HP, Shi TT, Liu SR. The protective effect of N-acetylcysteine magnesium against liver cirrhosis with portal hypertension in rat. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2012 Oct;26(5):366-9.
- 30- Kivia Queiroz de Andrade, Fabiana Andréa Moura, John Marques dos Santos, Orlando Roberto Pimentel de Araújo, Juliana Célia de Farias Santos, Marília Oliveira Fonseca Goulart. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 30269–30308
- 31- Toby Lawrence. The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Dec; 1(6): a001651.
- 32- Isaias Glezer, Tania Marcourakis, Maria Christina Werneck Avellar, Clarice Gorenstein, Cristoforo Scavone. The role of the transcription factor NF- $\kappa$ B in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. *Rev Bras Psiquiatr* 2000;22(1):26-30
- 33- Baldwin ASJ. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:649-83.
- 34- Samami, Y, Goldstein S, Dean O.M, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1830, 4117–4129.
- 35- Arranz, L, Fernandez, C, Rodriguez, Ribera J.M, de la Fuente M. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, 45, 1252–1262.
- 36- Oka, S, Kamata H, Kamata K, Yagisawa H, Hirata H. N-acetylcysteine suppresses TNF-induced NF-B activation through inhibition of IK kinases. *FEBS Lett.* 2000, 472, 196–202.
- 37- Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*. 2003;22:5734–5754.
- 38- Francielli Licks, Camila Marques, Cláudio Zetler, Maria Isabel Morgan Martins, Cláudio Augusto Marroni, Norma Possa Marroni. Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats. *Ann Hepatol*. 2014 May-Jun;13(3):370-7.
- 39- Andrea J. Moreira, Graziella Rodrigues, Silvia Bona, Carlos Thadeu Cerskia, Claudio A. Marroni, Jose L. Mauriz, Javier González-Gallego, Norma P. Marroni. Oxidative stress and cell damage in a model of precancerous lesions and advanced hepatocellular carcinoma in rats. *Toxicology Reports* 2 (2015) 333–340

40- Mari M, Colell A, Morales A, von Montfort C, Garcia-Ruiz C, Fernández-Checa J.C. Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2010, 12, 1295–1331.

41- Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf3 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 93, 14960-5.



#### 4.4 EXPERIMENTO IV

Apresentados no artigo IV: *Inflammatory bowel and oxidative stress changes in an experimental model of portal hypertension: action of N-acetylcysteine*, publicado na revista *Journal of Coloproctology*.



## Original Article

## Inflammatory bowel and oxidative stress changes in an experimental model of portal hypertension: action of N-acetylcysteine



Francieli Licks<sup>a,\*</sup>, Renata Minuzzo Hartmann<sup>b</sup>, Elizângela Schemitt<sup>b</sup>, Josieli Raskopf Colares<sup>d</sup>, Lúcio Sarubbi Fillmann<sup>c</sup>, Henrique Fillmann<sup>c</sup>, Norma Possa Marroni<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós Graduação em Medicina, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Programa de Pós Graduação em BioSaúde, Canoas, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 April 2016

Accepted 7 May 2016

Available online 6 July 2016

## Keywords:

N-acetylcysteine

Portal hypertension

Intestine

Oxidative stress

Inflammation

## ABSTRACT

**Introduction:** Portal hypertension (PH) is characterized by vasodilatation in the portal system and the bowel is one of the severely affected organs. N-acetylcysteine (NAC) is a molecule with important properties and widely used in clinical practice.

**Objective:** To evaluate NAC action in the bowel of animals submitted to the animal model of partial portal vein ligation (PPVL).

**Methods:** 18 male Wistar rats were divided into three experimental groups (n=6): sham-operated (SO), PPVL, and PPVL+NAC. On the 8th day after surgery, N-acetylcysteine (10mg/kg, ip) was administered daily for 7 days. On the 15th day the animals' bowel was collected for oxidative stress analysis, immunohistochemistry and Western blot. We evaluated the expression of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  by immunohistochemistry and of iNOS by Western blot. Lipid peroxidation was assessed by TBARS technique, and the activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) were checked.

**Results:** We observed an increased expression of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in PPVL group, and an increased iNOS expression assessed by Western blot. NAC reduced the expression of all proteins evaluated. We also observed an increase in oxidative stress in the bowel of mice PPVL group compared to controls (SO), and NAC was effective in reducing these values in PPVL+NAC group. Also, a reduction in the activity of SOD and GPx enzymes was observed in the diseased group, and NAC was able to restore the activity of the enzymes assessed.

**Conclusion:** We suggest the anti-inflammatory and antioxidant action of NAC in the bowel of animals submitted to PPVL model.

© 2016 Sociedade Brasileira de Coloproctologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding author.

E-mail: francieli.licks@gmail.com.br (F. Licks).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcol.2016.05.005>

2257-9363/© 2016 Sociedade Brasileira de Coloproctologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Alterações intestinais inflamatórias e de estresse oxidativo em modelo experimental de hipertensão portal: ação da N-acetilcisteína

### RESUMO

**Palavras-chave:**  
N-Acetilcisteína  
Hipertensão Portal  
Intestino  
Estresse Oxidativo  
Inflamação

**Introdução:** A Hipertensão Portal (HP) é caracterizada por uma vasodilatação no sistema portal, e o intestino é um dos órgãos gravemente acometidos. A N-acetilcisteína (NAC) é uma molécula com importantes propriedades, amplamente utilizada na clínica.

**Objetivo:** Avaliar a ação da NAC no intestino de animais submetidos ao modelo animal de ligadura parcial da veia porta (LPVT).

**Método:** Foram utilizados 18 ratos machos Wistar divididos em três grupos experimentais (n=6): Sham-operated (SO), LPVT, LPVT + NAC. No 8º dia após a cirurgia, a N-acetilcisteína (10 mg/kg/dp) foi administrada diariamente durante 7 dias. No 15º dia foi coletado o intestino dos animais para análise de estresse oxidativo, imunohistoquímica e Western blot. Nós avaliamos a expressão de NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  por imunohistoquímica e da iNOS por Western blot. A lipoperoxidação foi avaliada pela técnica de TBARS, e as atividades das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e GlutationalPeroxidase (GPa) foram verificadas.

**Resultado:** Observamos um aumento da expressão de NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  no grupo LPVT, e aumento na expressão da iNOS avaliada por Western blot. A NAC reduziu a expressão de todas as proteínas avaliadas. Observamos um aumento do estresse oxidativo no intestino dos ratos do grupo LPVT com relação aos controles (SO), sendo a NAC eficaz na redução desses valores no grupo LPVT + NAC. Ainda, uma redução na atividade das enzimas SOD e GPa no grupo doente, sendo a NAC capaz de restaurar a atividade das enzimas avaliadas.

**Conclusão:** Suprimimos a ação anti-inflamatória e antioxidante da NAC no intestino de animais submetidos ao modelo LPVT.

© 2016 Sociedade Brasileira de Coloproctologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Introduction

Portal hypertension (PH) is a syndrome whose clinical picture is established by the emergence of an anatomical obstacle in the portal system. This obstacle, which blocks the blood flow, causes blood damming at the site of obstruction. The compensatory mechanism of decompression in the portal system is the development of an important vasodilation in the splanchnic territory; in turn, this event is responsible for the main complications of the portal hypertension syndrome.<sup>1</sup>

We can correlate the development of a hyperdynamic collateral circulation with one of the major complications from PH: the bleeding from gastrointestinal varices, an event that is triggered when the portal pressure gradient rises above 12 mmHg.<sup>2</sup> The progressive vasodilation in the splanchnic territory is responsible for the appearance of these varicose veins, the most important being those located in the stomach and bowel. These conditions are known as Portal Hypertension Gastropathy (PHG) and Portal Hypertensive Colopathy (PHC), respectively, and the first of these conditions is already well established in the literature.<sup>3</sup>

Intestinal changes present in PH are still being elucidated and were gradually identified over the last decade as being mainly one of the causes of fatal gastrointestinal bleeding in patients with PH.<sup>4</sup> The pattern of lesions in cases of PH can be found in other parts of the gastrointestinal tract, including the intestine,<sup>5</sup> due to mucosal edema, inflammatory diseases, and ectopic and anorectal varices.<sup>6</sup>

The experimental model of Partial Portal Vein Ligation (PPVL) has been used by many authors to study the molecular changes in pre-hepatic portal hypertension.<sup>7-9</sup> In rats, the hemodynamic changes present in PH show up around the day 14 after surgery, and hyperdynamic circulation and splanchnic vasodilation are prevailing conditions in animals subjected to a PPVL model.<sup>10</sup> In addition, PHC and encephalopathy are among the most important manifestations resulting from this experimental model, and inflammatory mechanisms are aggravating factors in both manifestations.<sup>11</sup>

Inflammation is an event often associated with injuries of different origins. In the case of PH, systemic and splanchnic vascular responses appear to play an important role in the pathogenesis of hyperdynamic circulation and are very similar to those produced in the post-traumatic inflammatory response. The mechanical stress caused by the increased blood flow in the splanchnic territory stimulates the endothelium to secrete vasoactive substances, cytokines and growth factors, and this is a triggering factor for local or generalized inflammation.<sup>12</sup>

With respect to local inflammation, it is important to mention that the mucosa of the gastrointestinal tract is a major reservoir of macrophages and mast cells, and these cells located in the intestine are considered as effector cells that participate in the first line of defense of our body.<sup>13</sup> In the case of inflammation, the intestinal mucosa acquires a phenotypic pro-inflammatory profile, secreting cytokines that can amplify the systemic inflammatory vascular response.<sup>13</sup>

Among the cytokines secreted by the intestine after the initial stimulation, one must mention the tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), released by mast cells of the intestine and mesenteric lymph nodes. This proinflammatory cytokine is probably related not only to the inflammatory process present in PH but also to the development of hyperdynamic circulation, since it stimulates the primary route of splanchnic vasodilation, nitric oxide.<sup>14</sup> In addition, TNF- $\alpha$  is an extracellular stimulus for release of another pro-inflammatory cytokine, NF- $\kappa$ B. This factor induces phosphorylation in I $\kappa$ B, the cytoplasmic inhibitory protein that prevents the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B.<sup>15</sup>

The activation of nitric oxide (NO) is the main event proposed as a triggering factor for the development of collateral circulation in cases of PH. NO is synthesized by nitric oxide synthase (NOS), including, among its major isoforms, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and inducible nitric oxide synthase (iNOS). This latter isoform is associated with increased levels of NO production.<sup>16</sup> iNOS is mainly expressed in macrophages and smooth muscle cells, especially after the stimulation by lipopolysaccharides, or inflammatory cytokines.<sup>17</sup> This enzyme is modulated by transcription factors, among which NF- $\kappa$ B is considered the primary mediator of its activation, which, in turn, can be activated by the oxidative stress.<sup>18</sup>

Inflammatory cells are important sources for the generation of reactive oxygen species; thus the oxidative and inflammatory damage acts synergistically in the development and worsening of conditions in which these events are present.<sup>19</sup>

With HP, the role of oxidative stress is associated with the overproduction of nitric oxide, which determines the production of highly reactive species, for example, peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>).<sup>20</sup> Using the PPVL model, previous studies published by our study group have already shown this significant involvement in the pathogenesis of pre-hepatic portal hypertension,<sup>9,21,22</sup> as well as the participation of inflammation in gastric injury in this experimental model.<sup>23</sup>

This study aimed to evaluate the involvement of oxidative and inflammatory stress in the intestinal mucosa of rats with pre-hepatic portal hypertension. In addition, we aimed to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory action of N-acetylcysteine in intestinal injuries present in PPVL model.

## Material and methods

### Ethics

The experimental procedures with animals were carried out in accordance with the current Brazilian legislation in the practice of scientific research (Law 11,794, Official Gazette – October 8, 2008), Euthanasia Practice Guidelines of CONCEA (2013) and Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals for Scientific and Didactic Purposes – DECA (2013).

### Animals

The animals were acquired in the vivarium of HCPA according to the specifications of the Animal Experimentation Unit (UEA) and were maintained throughout the experiment in plastic

cages measuring 47 cm  $\times$  34 cm  $\times$  18 cm, lined with wood shavings, in a 12-h light/dark cycle and at a temperature of 22  $\pm$  4 °C. All animals were fed a commercially available animal food (Purina® – Nutrilpa, Porto Alegre, RS, Brazil) and had access to water *ad libitum*.

### Groups and experimental protocols

For this study, we used 18 male Wistar rats ( $\pm$ 250g) which were divided randomly into three groups (n=6): sham-operated (SO), PPVL, and PPVL + NAC.

On the first day of the experiment, the animals were weighed and anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) intraperitoneally (IP). We performed local asepsis and then made a mid-ventral laparotomy with a careful exposure of bowel loops with a gauze pad soaked in saline. All animals underwent the same surgical procedure; however, the animals in group SO were submitted only to the manipulation of the portal vein. The animals of PPVL and PPVL + NAC groups were submitted to an experimental model of Partial Portal Vein Ligation, described by Sikuler et al. 1985.<sup>7</sup>

We used a 20G needle to promote a partial obstruction of the portal vein; for this purpose, both the vessel and the needle were tied with silk 3-0. The immediate vasodilation of the splanchnic territory was observed and then the needle was gently withdrawn, leaving only the portal vein partially occluded. Next, intestinal loops were replaced into the abdominal cavity of the animals, and an infusion of 10 ml of saline was administered, and the peritoneum was sutured with continuous points. The epithelial layer was closed with individual sutures. The above-described model features a pre-hepatic portal hypertension.<sup>7</sup>

After completion of the surgical procedures, the animals were placed in individual cages for their recovery under analgesia with dipyrone (200 mg/kg); the first administration was performed by intramuscular route and the remaining was orally administered with a frequency of 8/8 h during the subsequent 72 h.

Seven days after surgery, the treatment was initiated in the respective groups. The animals in SO and PPVL groups received only the vehicle (0.9% NaCl, 0.6 ml IP). On the other hand, the animals in PPVL + NAC group received N-acetylcysteine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; CAS registry number 616-91-1) at a dose of 10 mg/kg dissolved in 0.6 ml of 0.9% NaCl. The treatment was carried out beginning on the 8th day, for seven days.

### Euthanasia and tissue collection

At the end of treatment on day 15, the animals were again weighed and anesthetized using the same protocol described above. After an inspection of the animal's state of anesthesia, a new laparotomy was made for removal of the intestines for subsequent analysis. A portion of the collected material was stored in a freezer at -80 °C, and the remainder was fixed in 10% buffered formalin for 24 h. After this period, 3-mm sections of the paraffin block were obtained using a rotary microtome.

### Immunohistochemistry

The histological technique of immunohistochemistry was used to evaluate the expression of the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in the animal's intestine. The reacquisition of the antigen was carried out using a buffer at 100°C; subsequently, the activity of endogenous peroxidase was blocked by incubation with absolute methanol. The slides were incubated with rabbit polyclonal antibody (NF- $\kappa$ B [sc-9072], 1: 200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and goat monoclonal antibody (TNF- $\alpha$  [sc-1351], 1: 200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) overnight at 4°C. Next, the material was washed and incubated with the secondary antibody goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004) for 30 min at room temperature. The slides were analyzed using a microscope equipped with a digital camera, and the images were captured using the Image-Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Quantification of the marking of both analytes was carried out by digital analysis with Adobe Photoshop® CS3 extended 10.0, using the counting of brown color stained pixels. The expression level was determined by multiplying the average density of the image by the percentage of the stained areas.<sup>24</sup>

### Western blot

The cytosolic extracts prepared on the basis of intestinal homogenates were used in Western blot, and protein values were determined by the Bradford method.<sup>25</sup> Then, protein lysates were fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis at 9–12% in an electrophoresis buffer (25 mM Tris, 0.2 M glycine, 3.5 mM SDS, pH 8.8) and then transferred to membranes of polyvinylidene fluoride (PVDF). Blocking of the membranes was done using a 5% solution of skimmed milk powder in PBS-Tween. Then, the PVDF membrane was incubated overnight at 4°C with the specific monoclonal primary antibody, mouse polyclonal antibody (NOS2 [sc-7271], Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After the overnight incubation, the membranes were washed with TTBS and incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody IgG-HRP sc-2005, anti-goat donkey (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:4000). After revealed, the bands were quantified using the Scion Image program, v. 4.02 for Windows (Scion Corporation, Frederick, USA). The results were expressed in arbitrary units.<sup>26</sup>

### Biochemical analyses

#### Homogenate

The intestines of the animals were homogenized for 1 min with Ultra-Turrax (IKA-WERK) in the presence of potassium chloride (KCl) 1.15% (5 mL/g of tissue) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) at a concentration of 100 mM in isopropanol (10  $\mu$ L/mL KCl added). Then, the homogenates were centrifuged for 10 min at 3000 rpm (1110  $\times$  g) in a refrigerated centrifuge (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) and the supernatant was removed and frozen in a freezer at -80°C for subsequent measurements.<sup>27</sup>

### Protein content

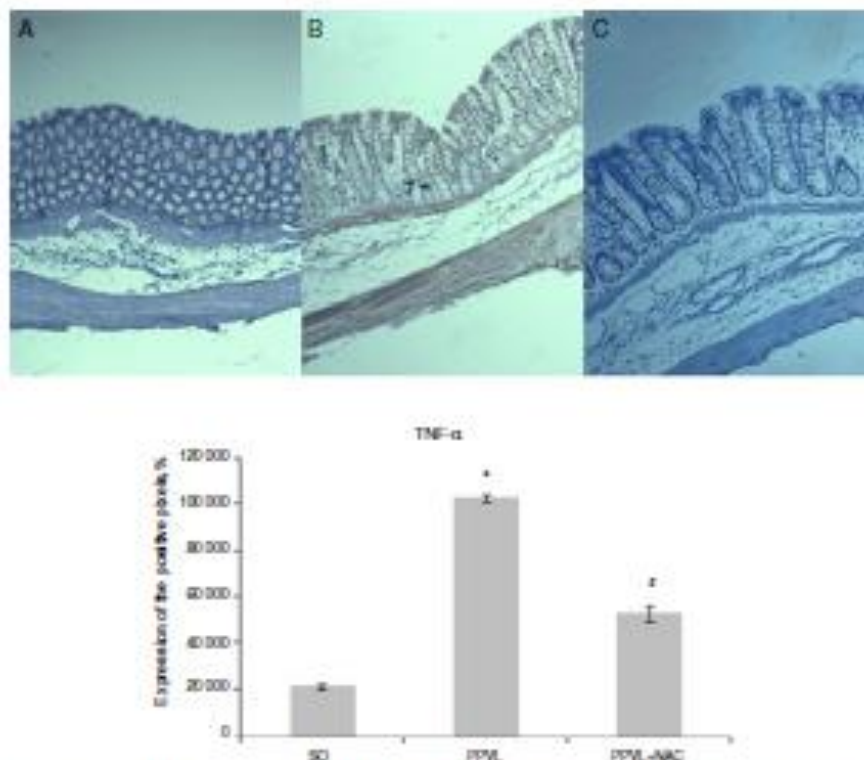
The protein concentration in the homogenates was determined by the Bradford method, with bovine albumin (SIGMA) used as a standard. The samples were measured spectrophotometrically at 595 nm, and the values were expressed in mg/mL. These values were used to calculate subsequently TBA-RS and the values of antioxidant enzymes SOD and GPx.<sup>28</sup>

### Determination of oxidative stress

For the determination of lipid peroxidation, we used the method of reactive substances to thiobarbituric acid (TBA-RS). The technique consists in heating the homogenate in the presence of thiobarbituric acid, with consequent formation of a pink color product, measured in a spectrophotometer at 535 nm. The appearance of color occurs due to the presence of malondialdehyde and other substances from lipid peroxidation in biological material. 0.5 mL of thiobarbituric acid (TBA) 0.67%, 0.25 mL of distilled water, 0.75 mL of trichloroacetic acid (TCA) 10%, and 0.25 mL of the homogenate were placed in a test tube, in this order. TBA reacts with lipid peroxidation products forming a Schiff base, and TCA exerts the function of denaturation of the proteins present and also acidifies the reaction medium. Then, each tube was stirred and heated to 100°C for 15 min. After that, the tubes were cooled and 1.5 mL of n-butyl alcohol was added to extract the pigment formed. The tubes were placed on a shaker (Blomatic) for 45 s and centrifuged for 10 min at 3000 rpm (1110  $\times$  g). Finally, the stained product was taken away and the reading was taken using a spectrophotometer (CARY 3E - UV - Visible Varian Spectrophotometer) at a wavelength of 535 nm. The concentration of TBA-RS is expressed as nmol/mg protein.<sup>28</sup>

The activity of superoxide dismutase (SOD) is defined by its ability to inhibit a detection system which reacts with  $O_2^{\cdot-}$ . For this purpose, adrenaline is used, which, in an alkaline medium, turns to adrenochrome, producing  $O_2^{\cdot-}$ , which it is the substrate of the enzyme. Before performing the determination with the homogenate, measurement of the reaction medium (50 mM glycine-NaOH, pH 9.6) was carried out with 50  $\mu$ L of adrenaline (50 mM, pH 2.0), corresponding to 100% of the reaction. This mixture was stirred and read at 480 nm. Subsequently, different volumes of the homogenate (50  $\mu$ L, 25  $\mu$ L, and 10  $\mu$ L) were added, and the inhibition of the reaction was measured. The enzymatic activity was expressed as SOD units/g of tissue (quantity of SOD able to inhibit in 50% the adrenaline reduction rate).<sup>29</sup>

The determination of glutathione peroxidase (GPx) using the Fiehá-Guntzler method<sup>30</sup> consists in measuring the NADPH consumption rate in a system containing GSH; the oxidation is recorded spectrophotometrically at a wavelength of 340 nm. To this end, 2.7 mL of a regulating solution of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> phosphates (100 mM, pH 7.0) with 50  $\mu$ L of NADPH (10 mM), 150  $\mu$ L of BOOH (10 mM) and 50  $\mu$ L of glutathione reductase (12 U/mL) were placed in a quartz cuvette. The mixture was read for 1 min; at this point, a baseline was established, and then 50  $\mu$ L of GSH (100 mM) and 50  $\mu$ L of the homogenate were added. The samples were incubated at 25°C for 5 min and read



**Fig. 1 – Immunohistochemistry of TNF- $\alpha$ .** Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on TNF- $\alpha$  expression. SO, Sham-operated group; PPVL, partial portal vein ligation; PPVL + NAC, partial portal vein ligation treated with NAC. \* $p < 0.001$ , # $p < 0.001$  ( $n = 6$ ).

at an absorbance of 340nm. The activity was expressed in nmol/min/mg protein.

#### Statistical analysis

All data were presented as a mean  $\pm$  standard error. Statistical analyses were calculated using Graphpad Instat software, version 3.0 for Windows. Analysis of variance (ANOVA) and the Student-Newman-Keuls test was used for multiple analyses, and the significance level was set at  $p < 0.05$  (5%).

## Results

### Immunohistochemistry

In assessing the expression of the protein TNF- $\alpha$  in the different experimental groups, we observed a significant increase in its markings in PPVL versus SO group ( $p < 0.001$ ). The administration of N-acetylcysteine in the proposed dose in this study was able to reduce the expression of TNF- $\alpha$  in PPVL + NAC group ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1).

The expression of NF- $\kappa$ B was increased in animals subjected to the experimental model of PPVL versus controls ( $p < 0.001$ ), and the values of PPVL + NAC group were

significantly reduced versus values for animals of the diseased group ( $p < 0.001$ ) (Fig. 2).

### Western Blot

Using Western blot, we observed a significant increase in iNOS expression in the intestine of animals of the diseased group ( $p < 0.01$ ). The animals treated with NAC had their values reduced, as observed in PPVL + NAC group ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3).

### Biochemical analyses

An increase was observed in lipid peroxidation, evaluated by TEA-RS in animals from PPVL versus OS group ( $p < 0.05$ ), and NAC was able to reduce these levels when administered to PPVL + NAC group ( $p < 0.01$ ) (Fig. 4).

SOD activity was also evaluated in the intestine of animals of different experimental groups: the activity was reduced in diseased versus control animals ( $p < 0.01$ ), and the treatment has proven effective in increasing the activity of this enzyme ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5).

Another antioxidant enzyme, GPx, was also evaluated in this study: We observed a similar behavior in PPVL ( $p < 0.05$ ), and in PPVL + NAC groups versus OS group ( $p < 0.01$ ) (Fig. 6).

## Discussion

The portal hypertension syndrome shows as characteristics the occurrence of ascites, hepatic encephalopathy, and a hyperdynamic collateral circulation<sup>21</sup>; this latter occurrence is considered the main cause of worsening of the general condition.

The collateral circulation develops in order to divert the blood flow from the obstructed territory; and the obstruction may be situated before (pre-hepatic), into (hepatic) or after (post-hepatic) the liver.<sup>22</sup> Regardless of the place of this obstruction, the unblocking compensatory mechanism will eventually result in the formation of varicose veins distributed along the digestive tract of the patient.

In general, varicose veins located in the colon are prevalent in the cecum and rectosigmoid region<sup>23</sup> and characterize portal hypertension colopathy (PHC). In this scenario, the risk of bleeding through colonic varices is 1-8%<sup>24</sup>; on the other hand, for rectal varicose veins, the risk is from 44 to 89% in cirrhotic patients.<sup>2</sup> In addition, vascular ectasia and microcirculatory changes along the intestinal mucosa damage its integrity and promote the development of a local inflammatory process.<sup>25</sup>

The intestinal inflammatory condition present in cases of portal hypertension is considered an aggravating factor in the pathogenesis of the disease. Among the pro-inflammatory cytokines involved in the process, TNF- $\alpha$  is considered as an important mediator, being produced by intestinal mast

cells.<sup>26</sup> In this study, we observed a significant increase of this cytokine in the intestine of animals of PPVL group (Fig. 1). The same behavior was observed in the evaluation of NF- $\kappa$ B, which was increased in relation to the animals of SO group (Fig. 2). These data are consistent with studies published, that report leukocyte infiltration and an inflammatory process in this same experimental model.<sup>27</sup>

N-acetylcysteine was able to reduce the expression of both cytokines evaluated in the intestine of animals of PPVL + NAC group. The anti-inflammatory properties of NAC have been previously described in inflammatory bowel diseases with encouraging results,<sup>28</sup> and these results may be related to its thiol group, which is important to combat oxidative stress and inflammation.<sup>29</sup> In addition, the treatment with NAC suppresses the activation of NF- $\kappa$ B and the subsequent production of its cytokines and also blocks TNF- $\alpha$  activation, causing structural changes in its receptor.<sup>40</sup>

The involvement of nitric oxide in this experimental model is well established in the literature. With the progression of the disease, the immune system is activated and the inducible form of NOS (iNOS) undergoes up-regulation.<sup>42</sup> In this study, the animals of PPVL group demonstrated a significant increase in the expression of iNOS versus animals of SO group in the evaluation by Western blot (Fig. 3). A previous study, published by our research group, observed the same behavior of this enzyme in the stomach of animals subjected to the same experimental model of partial portal vein ligation.<sup>33</sup>

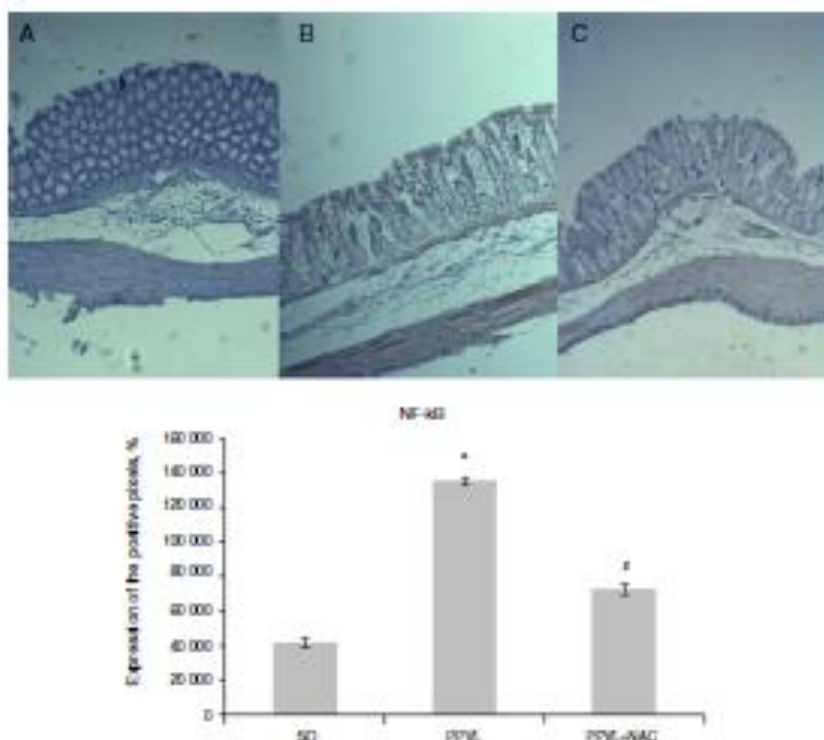
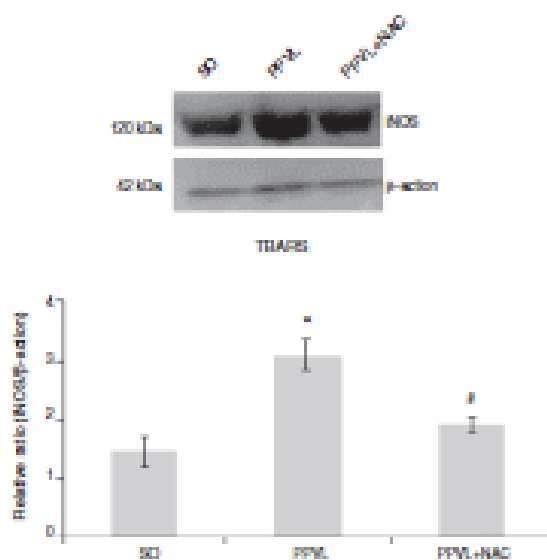


Fig. 2 - Immunohistochemistry of NF- $\kappa$ B. Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) administration on NF- $\kappa$ B. SO, Sham-operated group; PPVL, partial portal vein ligation; PPVL+NAC, partial portal vein ligation treated with NAC. \* $p < 0.001$ , <sup>#</sup> $p < 0.001$  (n = 6).

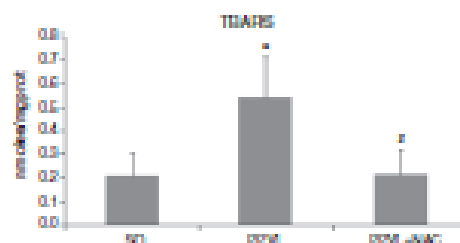


**Fig. 3 - Western blot of INOS.** Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) on INOS expression. SO, Sham-operated group; PPVL, partial portal vein ligation; PPVL + NAC, partial portal vein ligation treated with NAC. <sup>a</sup> $p < 0.01$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$  ( $n = 6$ ).

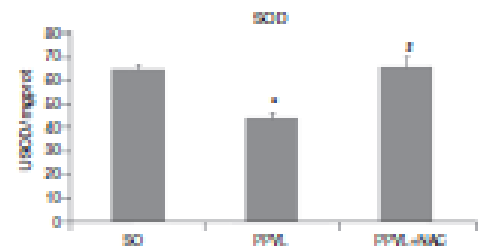
In this study, N-acetylcysteine was able to reduce the levels of INOS into the intestine of animals of PPVL + NAC group. This finding is in agreement with a previously published study, in which it was reported that NAC inhibits nitric oxide production by cells of the immune system and by the inducible isoform of NOS (iNOS).<sup>41</sup>

The involvement of oxidative stress in the development of hyperdynamic circulation was initially proposed by Femand et al. 1998.<sup>42</sup> Since then, several studies have demonstrated a positive correlation of the experimental model of partial portal vein ligation with the same oxidative impairments.<sup>33,21-23</sup>

In the present study, we observed increased levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) in animals subjected to this experimental model (Fig. 4). Furthermore, the increase of lipid peroxidation was accomplished by reducing



**Fig. 4 - TBA-RS.** Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) on TBA-RS values. SO, Sham-operated group; PPVL, partial portal vein ligation; PPVL + NAC, partial portal vein ligation treated with NAC. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$  ( $n = 6$ ).

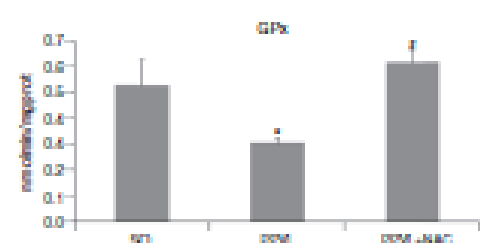


**Fig. 5 - SOD.** Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) on SOD activity. SO, Sham-operated group; PPVL, partial portal vein ligation; PPVL + NAC, partial portal vein ligation treated with NAC. <sup>a</sup> $p < 0.01$ , <sup>b</sup> $p < 0.05$  ( $n = 6$ ).

the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) (Fig. 5) and glutathione peroxidase (GPx). This finding demonstrates a potential condition of oxidative stress in the bowel of experimental animals. This is in agreement with previous studies in which PPVL triggered a condition of oxidative stress in other body organs studied: stomach<sup>3</sup> and liver.<sup>3</sup> The antioxidant action of N-acetylcysteine revolves around the fact that this molecule is a cysteine precursor for the synthesis of GSH, and also by acting directly as a free radical scavenger. Thanks to its antioxidant and anti-inflammatory properties, NAC has been widely studied in the treatment of liver diseases.<sup>40</sup>

The authors of this study have already used NAC in the treatment of experimental pre-hepatic portal hypertension, with very promising results.<sup>3,21</sup> This study demonstrated the role of this molecule in the bowel of animals subjected to the same model, which points to a systemic potential of this drug. NAC was able to reduce lipid peroxidation levels, as measured by TBA-RS, and to restore the activity of both antioxidant enzymes studied (SOD and GPx) in the animals' bowel. Thus, one can say that N-acetylcysteine acted as an antioxidant, reducing oxidative stress in the intestinal mucosa in animals with PPVL.

In conclusion, we point out an anti-inflammatory and antioxidant synergistic effect of N-acetylcysteine in the bowel of animals with portal hypertension. Judging by the results, NAC was able to reduce the intestinal damage in animals by



**Fig. 6 - GPx.** Effects of partial portal vein ligation (PPVL) and N-acetylcysteine (NAC) on GPx activity. SO, Sham-operated group; PPVL, partial portal vein ligation; PPVL + NAC, partial portal vein ligation treated with NAC. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$  ( $n = 6$ ).



reducing oxidative stress and inflammation - both being conditions extremely harmful and determinant in the evolution of the disease here studied.

### Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

### Acknowledgements

This study received financial support from the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE Project No. 11-0293) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We want also to thank the contribution of the Experimental Hepatology and Gastroenterology Laboratory (HCPA/UFRGS) and the Oxidative Stress and Antioxidants Laboratory (ULBRA), places of support and development of this study.

### REFERENCES

- Dmitry Viktorovich Garbuzenko. Contemporary concepts of the medical therapy of portal hypertension under liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2015;21:8117-26.
- Boech J, Grossmann RJ, Shah VH. Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: how changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J Hepatol.* 2015;62:5121-30.
- Gjorgjievski M, Cuppell MS. Portal hypertensive gastropathy: a systematic review of the pathophysiology, clinical presentation, natural history and therapy. *World J Hepatol.* 2016;8:2311-62.
- Mekaroonkarnol F, Cohen B, Chawla S. Portal hypertensive enteropathy. *World J Hepatol.* 2015;7:127-38.
- Miara V, Miara SP, Dwivedi M, Gupta SC. Histomorphometric study of portal hypertensive enteropathy. *Am J Clin Pathol.* 1997;108:652-7.
- Hooking SW, Smart HL, Johnson AG, Triger DR. Anorectal varices, haemorrhoids, and portal hypertension. *Lancet.* 1980;1:540-52.
- Sikuler E, Kravetz D, Grossmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol.* 1988;248:G618-25.
- Gonzales S, Perez MJ, Ferrazo JC, Tomaro ML. Antioxidant role of heme oxygenase-1 in prehepatic portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol.* 2006;12:4149-55.
- Licks F, Hartmann RM, Marques C, Schemit E, Colares JR, Soares M do C, et al. N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol.* 2015;21:12351-60.
- Geerts AM, Vanheule E, Fruet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp Path.* 2008;89:251-63.
- Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J. Portal hypertension and inflammation: lessons from the past. *Hepatology, Research Media*, in press.
- Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model.* 2007;4:44.
- Prieto J, Aller MA, Santamaría L, Nave MF, Madero R, Perez-Rebollo JF, et al. Prehepatic portal hypertension produces increased mast cell density in the small bowel and in mesenteric lymph nodes in the rat. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:1025-31.
- Gordon JR, Galli SJ. Mast cell as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature.* 1993;362:274-6.
- Glezer I, Marcourakis T, Avellar MCW, Gornstein C, Scavone C. The role of the transcription factor NF-kB in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. *Rev Bras Psiquiatr.* 2000;22:26-30.
- Hu LS, George J, Wang JH. Current concepts on the role of nitric oxide in portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 2012;18:1707-17.
- Pauz A, Art J, Hahn S, Newag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2010;23:75-93.
- Mankan AK, Lawless MW, Gray SG, Kelleher D, McManus B. NF-kappaB regulation: the nuclear response. *J Cell Mol Med.* 2008;12:631-43.
- Crowley SD. The cooperative roles of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20:102-20.
- Vercolino R, Tieppo J, Dias AS, Marroni CA, Garcia F, Mearns L, et al. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;102:370-6.
- Licks F, Marques C, Zetler C, Martins MI, Marroni CA, Marroni MF. Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats. *Ann Hepatol.* 2014;13:370-7.
- Marques C, Licks F, Zattoni I, Borges B, de Souza LF, Marroni CA, et al. Antioxidant properties of glutathione and its role in VEGF-Akt pathways in portal hypertension gastropathy. *World J Gastroenterol.* 2013;19:4464-74.
- Movira AJ, Faga C, Alorzo M, Collado PS, Zetler C, Marroni C, et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 2004;68:1939-46.
- Galley M, Mills SE, Swanson PE, Zarbo RJ, Shah AR, Wick MR. Immunoreactivity for HER-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors, and malignant mesotheliomas. *Am J Surg Pathol.* 1992;16:503-9.
- 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;72:248-54.
- Towbin H, Sheshbera T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76:4350-4.
- Llewy ST, Milei J, Molina H, Roverio A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori.* 1985;71:241-9.
- Baugs JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
- Miara HF, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247:3170-5.
- Flohe L, Gunzler WA, Scheck HB. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973;22:132-4.

31. Sauerbruch T, Trebicka J. Future therapy of portal hypertension in liver cirrhosis – a guess. *F1000Prime Rep.* 2014;6:35.
32. Martinelli AL. Hipertensão portal. *Medicina.* 2004;37:253–61.
33. Sharma M, Ramasubbabu CS. Collateral pathways in portal hypertension. *J Clin Exp Hepatol.* 2013;3:338–52.
34. Ganguly S, Saini SK, Bhatia V, Lakshmi D. The prevalence and spectrum of colonic lesions in patients with cirrhotic and noncirrhotic portal hypertension. *Hepatology.* 1995;21:1226–31.
35. Luigiano C, Iacobino G, Jodica A, Virgilio C, Peta V, Abenavoli L. Role of endoscopy in management of gastrointestinal complications of portal hypertension. *World J Gastrointest Endosc.* 2015;7:1–12.
36. Coulon S, Heindryckx K, Geurts A, Van Steenkiste C, Colle I, Van Vlierberghe H. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int.* 2011;31:146–62.
37. Aller MA, de las Heras N, Nave MP, Bagadera J, Arias J, Lahera V. Splanchnic-aortic inflammatory axis in experimental portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 2013;19: 7992–9.
38. Moura FA, de Andrade EQ, Dos Santos JC, Araújo OR, Goulart MO. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: does it work. *Redox Biol.* 2015;5:517–39.
39. Derkoick C, Willoughby D. The antioxidant role of glutathione and N-acetylcysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Int Soc Sports Nutr.* 2005;9:38–44.
40. de Andrade EQ, Moura FA, dos Santos JM, de Araújo OR, de Farias Santos JC, Goulart MO. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: therapeutic possibilities of N-acetylcysteine. *Int J Mol Sci.* 2015;16:30269–308.
41. Hou Y, Wang L, Yi D, Ding B, Yang X, Li J, et al. N-acetylcysteine reduces inflammation in the small intestine by regulating redox, EGF and TLR4 signaling. *Amino Acids.* 2013;45:513–22.
42. Fernando B, Marley B, Holt S, Anand B, Harry D, Sanderson F, et al. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertensive rat. *Hepatology.* 1998;28:689–94.

## 5 DISCUSSÃO GERAL

Os resultados apresentados nessa Tese permitem o maior entendimento da fisiopatologia da Hipertensão Portal, bem como apontam uma reflexão a respeito N-acetilcisteína como um eventual tratamento alternativo na atenuação dos danos gástricos e intestinais presentes nesta síndrome. A NAC é um antioxidante (Dean *et al.*, 2011) com propriedades anti-inflamatórias (De Andrade *et al.*, 2015) cuja ações parecem ser promissoras em uma síndrome de cunho inflamatório e oxidativo como a hipertensão portal.

A síndrome da hipertensão portal é responsável por uma alta taxa de mortalidade entre pacientes (Bolognesi *et al.*, 2017). Assim, há importância na investigação de alternativas plausíveis no tratamento da mesma. Os achados decorrentes desta síndrome na circulação mesentérica devem ser considerados em duas circunstâncias: associada à cirrose e decorrente da obstrução portal, sem cirrose. Quando há cirrose, a repercussão geral é mais intensa e grave devido à disfunção hepatocitária, que desempenha um importante fator de agravamento clínico. Há alteração metabólica, diminuição da síntese proteica, de fatores imunológicos e de coagulação. As infecções, encefalopatia e hemorragias difusas são frequentes com a cirrose e quase não ocorrem na hipertensão portal sem cirrose. Mesmo havendo diferenças nas características evolutivas da hipertensão portal, os mecanismos fisiopatogênicos do aumento da pressão portal são idênticos e largamente utilizados para o estudo da circulação hiperdinâmica (Sauerbruch e Trebicka, 2014).

No caso deste trabalho, cujo objetivo foi estudar as alterações gástricas e intestinais decorrentes do desarranjo hemodinâmico presente na síndrome da hipertensão portal, bem como a ação da NAC nesses tecidos, optamos por utilizar um modelo experimental característico de hipertensão portal pré-hepática: o modelo de ligadura parcial da veia porta (LPVP), conforme descrito na seção de material e métodos (Sikuler *et al.*, 1985).

Inicialmente, determinamos a eficácia deste modelo experimental como indutor de hipertensão portal através da mensuração da pressão portal. Os

animais submetidos ao modelo LPVP demonstraram valores elevados de pressão na veia mesentérica quando comparados aos controles.

Verificamos ainda um aumento dos níveis de óxido nítrico no estômago dos animais LPVP, sendo esse fato condizente com a elevação dos valores de NO sérico em pacientes com hipertensão portal (Gjeorgjievski e Cappell, 2016). Esse resultado demonstrou o papel central desta molécula no estabelecimento da circulação colateral hiperdinâmica. Os altos níveis de óxido nítrico foram associados ao agravamento da doença. Desta forma, decidimos estudar a principal via de ativação do óxido nítrico na HP, segundo a literatura, a via óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Marques *et al.*, 2013), bem como a modulação da NAC na mesma.

A produção intravascular de eNOS e conseqüente elevação de níveis do óxido nítrico pode ser estimulada principalmente pelo estresse de cisalhamento, ou “*shear stress*”, o qual é disparado na hipertensão portal devido ao aumento da pressão (Kuo e Schroeder, 1994). Outro estímulo importante para a produção de NO é justamente o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), uma peça-chave no desenvolvimento da circulação colateral (Abralde *et al.*, 2006). Ambos estavam elevados no estômago dos animais com ligadura parcial de veia porta. Ainda, encontramos altos níveis de HSP90 e TNF- $\alpha$  no estômago dos animais com hipertensão portal, sendo esses apontados na literatura como vias secundárias de estímulo à síntese NO via eNOS (Martell *et al.*, 2010).

A ativação desta chaperona no modelo animal de hipertensão portal nos demonstrou que esta proteína também exerce papel contribuinte no desenvolvimento da circulação hiperdinâmica, e o TNF- $\alpha$ , por sua vez, apontou a simultaneidade do estabelecimento deste quadro com o processo inflamatório. Outra ação do TNF- $\alpha$ , estabelecida com os resultados desta tese, foi justamente a ativação de uma outra citocina pró-inflamatória, o NF-kB, que, por sua vez, contribui para a síntese de NO via óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Moreira *et al.*, 2004).

A produção de óxido nítrico via iNOS neste modelo experimental foi demonstrada nos nossos experimentos, uma vez que esta proteína também se mostrou aumentada no estômago dos animais com hipertensão portal. A maior expressão da iNOS contribuiu para o agravamento da doença, bem como para o

estabelecimento de um quadro inflamatório local. O TNF- $\alpha$ , ainda, estimula diretamente o NF- $\kappa$ B, garantindo uma super-produção de iNOS (Kavianiet *al.*, 1997) que contribui para o desenvolvimento da circulação colateral e processo inflamatório (Gjeorgjievski e Cappell, 2016).

O envolvimento do óxido nítrico na fisiopatologia da doença é relacionado não somente com o quadro de vasodilatação esplâncnica, mas também com o fato desta molécula ser potencialmente lesiva aos tecidos. O NO reage facilmente com o ânion radical superóxido ( $O_2^{\circ}$ ) e gera produtos conhecidos como espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), responsáveis pelo quadro de estresse nitrosativo (Iwakiri e Kim, 2015). Verificamos uma alta produção de peroxinitrito no estômago dos animais através da avaliação da presença de Nitrotirosina (NTT), um composto formado através da reação do peroxinitrito com resíduos de tirosina e tirosina livre (Tenget *al.*, 2016).

Não somente o quadro de estresse nitrosativo foi verificado, mas também de estresse oxidativo. Os altos índices de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador de lipoperoxidação, juntamente com a menor atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutationaperoxidase (GPx), encontrados no estômago, determinou a relação entre o estresse oxidativo e o quadro de gastropatia da hipertensão portal. Ainda, ao verificarmos a expressão da SOD, por *Western blot*, concluímos que esta estava aumentada, embora sua atividade estivesse diminuída.

Uma maior expressão acompanhada de uma menor atividade enzimática nos aponta, mais uma vez, uma grande produção de ânion radical superóxido (Moreira *et al.*, 2015) que, por sua vez, pode ser relacionada aos altos níveis de óxido nítrico (Hu *et al.*, 2013). Outra molécula antioxidante a qual verificamos uma maior expressão no tecido gástrico foi a NAD(P)H quinonaoxidoredutase1 (NQO1) que, embora menos eficaz que a SOD, apresenta uma importante contribuição na redução da biodisponibilidade do ânion radical superóxido (Ma,2013).

Conforme descrito na literatura, o estresse oxidativo compromete a atividade de enzimas/proteínas e lipídeos (Li *et al.*, 2015). Verificamos esses eventos no estômago dos animais com hipertensão portal, conforme acima descrito. Do mesmo modo, o comprometimento de bases de DNA pelo

desequilíbrio redox é também descrito (Grindelet *al.*, 2016). Constatamos este fato por meio do ensaio cometa no qual observamos aumento de dano ao DNA no sangue de animais pertencentes ao grupo LPVP. Esse dado é inédito na literatura, uma vez que este ensaio nunca havia sido realizado neste modelo experimental.

Com os resultados obtidos até este momento, pudemos concluir que os animais com hipertensão portal demonstraram um quadro muito bem estabelecido de estresse oxidativo, nitrosativo e processo inflamatório, quando avaliado o estômago e sangue desses animais.

A literatura traz-nos pouca informação a respeito do quadro de Colopatia da Hipertensão portal. Existem muitas controvérsias e, embora na clínica este quadro seja relativamente frequente, a literatura é consideravelmente escassa. Ao contrário dos trabalhos publicados a respeito do quadro de Gastropatia, não existe consenso a respeito do modelo experimental adequado para estudar as alterações intestinais presentes na síndrome da hipertensão portal. Dessa forma, nosso próximo passo foi avaliar se poderíamos verificar alterações no intestino dos animais utilizando o mesmo modelo e tempo experimental utilizado para estabelecer a Gastropatia. De fato, obtivemos dados muito semelhantes àqueles encontrados no estômago dos animais sob as mesmas condições experimentais anteriormente publicadas.

Verificamos o estabelecimento do quadro de estresse oxidativo, condizente com elevados níveis de lipoperoxidação avaliada por TBARS, bem como atividade enzimática da SOD e GPx diminuídas no intestino. Ainda, a maior expressão da iNOS foi associada a maiores concentrações de NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$ , sugerindo o estabelecimento do processo inflamatório intestinal. Esse cenário leva-nos a crer que exista uma íntima relação entre a inflamação e as alterações de microbiota frequentemente citadas na literatura (Ostaffet *al.*, 2013). Nosso próximo passo é, de fato, verificar estas específicas alterações, conforme será descrito na seção de perspectivas.

Assim, pudemos concluir que o desenvolvimento da Colopatia induzida pela Hipertensão portal está associado com estresse oxidativo, nitrosativo e inflamação. Além disso, o estabelecimento da Colopatia parece ocorrer no mesmo

tempo experimental necessário para o estabelecimento do quadro de Gastropatia da hipertensão portal.

No entanto, nossos objetivos eram não somente estudar as alterações gástricas e intestinais, bem como suas vias de ativação na hipertensão portal pré-hepática, e também avaliar a ação de um tratamento antioxidante e anti-inflamatório na atenuação dos danos desencadeados por esta síndrome. O tratamento eleito foi a N-acetilcisteína (NAC), devido ao fato deste fármaco ser muito bem tolerado, utilizado na clínica médica, e considerado um tratamento farmacológico eficaz (Shahripouret *al.*, 2014).

A presente tese demonstrou que a NAC foi capaz de reverter todos os parâmetros analisados no estômago e intestino, além de não ter demonstrado nenhuma ação genotóxica, avaliada no sangue dos animais.

Concluimos que o importante papel da NAC na modulação de todo o quadro hemodinâmico acima descrito ocorre devido à sua capacidade de reduzir a biodisponibilidade de óxido nítrico através da interação do seu componente tiol com o NO, e a posterior formação de nitrosotiol (Zhuanget *al.*, 2012). Reduzindo a disponibilidade de óxido nítrico, a NAC foi capaz de atenuar o desenvolvimento da circulação colateral, avaliada histologicamente. Conseqüentemente, a via de ativação da eNOS via estresse de cisalhamento foi anulada.

O mesmo pode ser afirmado quando analisado a redução do VEGF no estômago desses animais. O fato de ter uma menor biodisponibilidade de óxido nítrico, bem como uma menor pressão no sistema portal, reduziu o desenvolvimento da circulação colateral hiperdinâmica e, dessa forma, não houve mais liberação de fator de crescimento vascular endotelial. A produção de HSP90 também reduziu no estômago dos animais tratados, uma vez que não havia estímulo fisiológico para uma maior produção de óxido nítrico via eNOS.

As propriedades anti-inflamatórias da NAC na gastropatia e na colopatia foram demonstradas pela redução nas expressões de NF-kB e TNF- $\alpha$  em ambos os tecidos estudados. Os diminuídos níveis de TNF- $\alpha$  acarretaram em uma menor estimulação da síntese de NO via eNOS, avaliada no estômago. O fator de necrose tumoral, por sua vez, não estimulou a via do NF-kB, e conseqüentemente acarretou em uma menor síntese de NO via iNOS, avaliada no estômago e intestino.

As propriedades antioxidantes da NAC na gastropatia e colopatia também foram estabelecidas. Esta molécula foi capaz de reduzir a lipoperoxidação no estômago e intestino, bem como restaurar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx. A expressão da NQO1 no tecido gástrico também se mostrou significativamente reduzida, levando-nos a crer que houve uma redução na concentração de ânion radical superóxido. Este fato foi confirmado por meio da avaliação dos níveis de NTT no estômago dos animais tratados, que também se mostraram diminuídos.

Por fim, nosso segundo experimento nos mostrou que a NAC não exercia nenhum efeito genotóxico na dose utilizada, fato esse que nos levou a excluir nosso grupo controle tratado por fins de redução amostral. Por outro lado, esta molécula atuou revertendo o índice de dano ao DNA no tecido sanguíneo analisado. Dessa forma, concluímos que a N-acetilcisteína exerce ação antioxidante, anti-inflamatória e antigenotóxica na Gastropatia e Colopatia da Hipertensão Portal, em modelo animal de ligadura parcial da veia porta.



## 6 CONCLUSÕES

Concluimos que a N-acetilcisteína exerce ação antioxidante, anti-inflamatória e antígenotóxica na Gastropatia e Colopatia da Hipertensão Portal, em modelo animal de ligadura parcial da veia porta.

### 6.1 CONCLUSÕES ARTIGO I

***Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats. Ann Hepatol 2014; 13(3):370-377.***

Neste artigo são respondidos os seguintes objetivos:

1. Mensurar a pressão portal através da veia mesentérica nos diferentes grupos experimentais;

O modelo de ligadura parcial da veia porta aumentou os valores de pressão portal nos animais do grupo LPVP, sendo a NAC capaz de reduzir estes valores no grupo tratado.

2. Avaliar os níveis séricos das aminotransferases aspartato (AST) e alanina (ALT) e da fosfatase alcalina (FA) nos diferentes grupos experimentais;

Não observamos nenhuma diferença nos níveis séricos das enzimas avaliadas, demonstrando que o modelo animal utilizado não infligiu nenhum dano hepático, caracterizando um modelo experimental pré-hepático.

3. Avaliar a lipoperoxidação utilizando o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;

Os animais submetidos ao modelo LPVP apresentaram altos níveis de lipoperoxidação no estômago, avaliado pela técnica de TBARS, quando

comparados aos demais grupos. O tratamento com a NAC foi capaz de reduzir os níveis de estresse oxidativo nos animais do grupo LPVP+NAC.

4. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;

A atividade das enzimas SOD e GPx apresentou-se reduzida no grupo LPVP, sendo a NAC eficaz em restaurar a atividade de ambas as enzimas no estômago dos animais estudados.

5. Avaliar os metabólitos de óxido nítrico (nitritos e nitratos) no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;

Os níveis dos metabólitos de óxido nítrico estavam aumentados no estômago dos animais com hipertensão portal. O tratamento com a NAC reduziu os níveis de nitritos e nitratos no tecido analisado.

6. Avaliar as alterações histopatológicas no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais, bem como o calibre dos vasos na submucosa gástrica.

Observamos alterações histológicas condizentes com um quadro de vasodilatação no estômago dos animais submetidos à ligadura parcial da veia porta. A NAC reduziu o calibre dos vasos no estômago dos animais tratados.

## 6.2 CONCLUSÕES ARTIGO II

***N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats World J Gastroenterol 2015; 21(43):12351-12360.***

Neste artigo são respondidos os seguintes objetivos:

1. Avaliar a imunorreatividade das proteínas eNOS, VEGF e Nitrotirosina (NTT) pelo método de imunohistoquímica no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;

Observamos um aumento significativo da expressão das proteínas avaliadas pelo método de imunohistoquímica no estômago dos animais do grupo com hipertensão portal, sendo a NAC capaz de reduzir a expressão de todas.

2. Avaliar a expressão das proteínas eNOS e VEGF pela técnica de Western blot no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;

A expressão das proteínas eNOS e VEGF, avaliada por Western blot, demonstrou-se aumentada no grupo LPVP. A NAC reduziu a expressão de ambas no estômago dos animais tratados.

3. Avaliar o dano ao DNA através do ensaio cometa no sangue dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Observamos um aumento do dano ao DNA no sangue dos animais com hipertensão portal, e a NAC reduziu esse dano nos animais do grupo LPVP+NAC.

### 6.3 CONCLUSÕES ARTIGO III

***Synergistic antioxidant and anti-inflammatory action of N-acetylcysteine in portal hypertensive gastropathy in rats.***

Neste artigo são respondidos os seguintes objetivos:

1. Avaliar a imunorreatividade das proteínas NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  pelo método de imunohistoquímica no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais;

Observamos um aumento significativo da expressão das proteínas avaliadas pelo método de imunohistoquímica no estômago dos animais do grupo com hipertensão portal, sendo a NAC capaz de reduzir a expressão de ambas.

2. Avaliar a expressão das proteínas HSP90, NQO1, iNOS e SOD pela técnica de Western blot no estômago dos animais dos diferentes grupos experimentais.

A expressão das proteínas HSP90, NQO1, iNOS e SOD, avaliada por Western blot, demonstrou-se aumentada no grupo LPVP. A NAC reduziu a expressão de ambas no estômago dos animais tratados.

#### 6.4 CONCLUSÕES ARTIGO IV

***Inflammatory bowel and oxidative stress changes in an experimental model of portal hypertension: action of N-acetylcysteine. J Coloproctol 2016; 36(4):231–239.***

Neste artigo são respondidos os seguintes objetivos:

1. Avaliar a lipoperoxidação utilizando o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no intestino grosso dos animais dos diferentes grupos experimentais;

Os animais submetidos ao modelo LPVP apresentaram altos níveis de lipoperoxidação no intestino grosso, avaliado pela técnica de TBARS, quando comparados aos demais grupos. O tratamento com a NAC foi capaz de reduzir os níveis de estresse oxidativo nos animais do grupo LPVP+NAC.

2. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) no intestino dos animais dos diferentes grupos experimentais;

A atividade das enzimas SOD e GPx apresentou-se reduzida no grupo LPVP, sendo a NAC eficaz em restaurar a atividade de ambas as enzimas no intestino dos animais estudados.

3. Avaliar a imunorreatividade das proteínas NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$  pelo método de imunohistoquímica no intestino dos animais dos diferentes grupos experimentais;

Observamos um aumento significativo da expressão das proteínas avaliadas pelo método de imunohistoquímica no intestino dos animais do grupo com hipertensão portal, sendo a NAC capaz de reduzir a expressão de ambas.

4. Avaliar a expressão da proteína iNOS pela técnica de Western blot no intestino dos animais dos diferentes grupos experimentais.

A expressão da proteína iNOS, avaliada por Western blot, demonstrou-se aumentada no grupo LPVP. A NAC reduziu a expressão desta proteína no intestino dos animais tratados.

## 7 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados apresentados nesta Tese, nossas perspectivas futuras são embasadas na possível relação das alterações intestinais demonstradas em modelo de Ligadura Parcial da Veia Porta, com a alteração na microbiota destes animais.

Em parceria com o Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais, localizado na TECNOPUC (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, Brasil), iremos sequenciar o genoma das bactérias presentes no intestino dos diferentes grupos experimentais. Esperamos que o modelo experimental utilizado possibilite alterações na microbiota intestinal, fato esse que irá correlacionar todas as alterações intestinais apresentadas nesta tese, com a disbiose nesses animais.

## REFERÊNCIAS

ABRALDES, J.G.; PASARÍN, M.; GARCÍA-PAGÁN, J.C. Animal models of portal hypertension. *World journal of gastroenterology*, v. 12, n. 41, p. 6577-84, 2006.

AIRES, M.M. Fisiologia 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

AL-BUSAFI, S.A.; MCNABB-BALTAR, J.; FARAG, A.; et al. Clinical Manifestations of Portal Hypertension. *International journal of hepatology*, v. 2012, 2012.

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; CRUZ, A.; ARIAS, J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, v. 4, p. 44, 2007.

ALLER, M.A.; DE LAS HERAS, N.; NAVA, M.P.; et al. Splanchnic-aortic inflammatory axis in experimental portal hypertension. *World J Gastroenterol.* v. 19, p. 7992-9, 2013.

ALLER, M.A.; VARA, E.; GARCIA, C.; et al. Proinflammatory Liver and Antiinflammatory Intestinal Mediators Involved in Portal Hypertensive Rats. *Mediators of inflammation*, v. 2005, n. 2, p. 101-11, 2005.

ALUNOS ONLINE. Anatomia e Fisiologia – Sistema digestório. Disponível em: <alunosonline.uol.com.br/biologia/sistema-digestorio.html>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2017.

ANDRADE, J. Q.; MOURA, A. F.; SANTOS, J. M.; et al. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *International journal of molecular sciences*, v. 16, p. 30269-308, 2015.

ASSOCIATION AVM. AVMA Guidelines on Euthanasia – Formerly Report of the AVNA. AVNA Papel on Euthanasia, 2007.

BALDWIN, A.S.J. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, v. 14, n. 1, p. 649-83, 1996.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; et al. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological reviews*, v. 94, n. 2, p. 329-54, 2014.

BIECKER E. Gastrointestinal Bleeding in Cirrhotic Patients with Portal Hypertension. *ISRN hepatology*, v. 2013, 2013.

BIOLOJA. Anatomia e Fisiologia Humana – O Sistema Digestório. Disponível em: <<http://www.afh.bio.br/digest/digest1.asp>>. Acesso em: 20 de março de 2017.



BOLOGNESI, M.; PASCOLI, M.D.; VERARDO, A.; et al. Splanchnic vasodilation and hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 10, p. 2555-63, 2014.

BOLOGNESI, M., PASCOLI, M.D., SACERDOTI, D. Clinical role of non-invasive assessment of portal hypertension. *World journal of gastroenterology*, v.23, n. 1, p. 1-10, 2017.

BONA, S.; FILIPPIN, L.I.; DI NASO, F.C.; et al. Effect of Antioxidant Treatment on Fibrogenesis in Rats with Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis. *ISRN gastroenterology*, v. 2012, 2012.

BOSCH, J.; GROSZMANN, R.J.; SHAH, V.H. Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: How changes in paradigm are leading to successful new treatments. *Journal of hepatology*, v. 62, n. 1, p. 121-30, 2015.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-54, 1976.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, v. 52, p. 302-10, 1978.

CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, n. 6, 2002.

CHEN, Y.; DONG, H.; THOMPSON, D.C.; et al. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. *Food and chemical toxicology*, v. 60, p. 38-44, 2013.

CONSTANZO, L.S. Fisiologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

DE ANDRADE, K.Q.; MOURA, F.A.; DOS SANTOS, J.M.; et al. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 12, p. 30269-308, 2015.

DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*, v. 36, n. 2, p. 78, 2011.

DIAZ-SANCHEZ, A.; NUÑEZ-MARTINEZ, O.; GONZALEZ-ASANZA, C.; et al. Portal hypertensive colopathy is associated with portal hypertension severity in cirrhotic patients. *World J Gastroenterol*, v. 15, n. 38, p. 4781-7, 2009.

DOUGLAS, C. R. Fisiologia aplicada à nutrição. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

DUDEJA, V.; VICKERS, S.M.; SALUJA, A.K. The role of heat shock proteins in gastrointestinal diseases. *Gut*, v. 58, n. 7, p. 1000-9, 2009.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Nitric oxide revision. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 343-50, 2003.

FAINTUCH J, AGUILAR PB, NADALIN W. Relevance of N-acetylcysteine in clinical practice: fact, myth or consequence? *Nutrition*, v. 15, n. 2, p. 177-179, 1999.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FERNANDEZ, M.; MEJIAS, M.; ANGERMAYR, B.; et al. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *Journal of hepatology*, v. 43, n. 1, p. 98-103, 2005.

FERNANDO, B.; MARLEY, R.; HOLT, S. N-Acetylcycteine Prevents Development of the Hyperdinamic Circulation in the Portal Hypertensive Rat. *Hepatology*, v. 28, n. 3, p. 689-94, 1998.

FILLMANN, H.; KRETZMANN, N.A.; SAN-MIGUEL, B.; et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and downregulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology*, v. 236, n. 3, p. 217-26, 2007.

FLOHE, L.; GUNZLER, W.A.; SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS letters*, v. 32, n. 1, p. 132-4, 1973.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, v. 33, n. 7, p. 829-37, 2012.

GAFFEY, M.J.; MILLS, S.E.; SWANSON, P.E.; et al. Immunoreactivity for BER-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors, and malignant mesotheliomas. *The American journal of surgical pathology*, v. 16, n. 6, p. 593-9, 1992.

GARBUZENKO, D.V. Contemporary concepts of the medical therapy of portal hypertension under liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 21, n. 20, p. 6117, 2015.

GARCIA-CARDENA, G.; FAN, R.; SHAH, V.; et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, v. 392, n. 6678, p. 821-824, 1998.

GIN-HO, L.O. Mechanism of portal hypertensive gastropathy: An unresolved issue. *Journal of gastroenterology and hepatology*, v. 24, n. 9, p. 1482-3, 2009.

GJEORGJIEVSKI, M.; CAPPELL, M.S. Portal hypertensive gastropathy: A systematic review of the pathophysiology, clinical presentation, natural history and therapy. *World journal of hepatology*, v. 8, n. 4, p. 231, 2016.

GLEZERA, I.; MARCOURAKISA, T.; AVELLARC, M.C.W.; et al. O fator de transcrição NF-kB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Rev Bras Psiquiatr*, v. 22, n. 1, p. 26-30, 2000.

GOLDIM, J.R.; RAYMUNDO, M.M. 1997. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. *Pesquisa em saúde e direitos dos animais*, 1997.

GRANGER, D.L.; ANSTEY, N.M.; MILLER, W.C.; et al. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in enzymology*, v. 301, p. 49-61, 1999.

GRINDEL, A.; GUGGENBERGER, B.; EICHBERGER, L.; et al. Oxidative Stress, DNA Damage and DNA Repair in Female Patients with Diabetes Mellitus Type 2. *PLoS one*, v. 11, n. 9, p. e0162082, 2016.

HALL, J.E. Guyton & Hall. Tratado de fisiologia médica. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Health Sciences, 2011.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, n. 5, p. 1147-50, 2007.

HARTMANN, R.M.; FILLMANN, H.S.; MARTINS, M.I.; et al. *Boswellia serrata* has beneficial anti-inflammatory and antioxidant properties in a model of experimental colitis. *Phytotherapy Research*, v. 28, n. 9, p. 1392-8, 2014.

HARTMANN, R.M.; MORGAN-MARTINS, M.I.; TIEPPO, J.; et al. Effect of *Boswellia serrata* on Antioxidant Status in an Experimental Model of Colitis Rats Induced by Acetic Acid. *Digestive diseases and sciences*, v. 57, n. 8, p. 2038-44, 2012.

HÄUSSINGER, D.; KIRCHEIS, G.; FISCHER, R.; et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *Journal of hepatology*, v. 32, n. 6, p. 1035-38, 2000.

HEPCENTRO. Gastropatia da Hipertensão Portal. Disponível em: <[www.hepcentro.com.br/gastropatia\\_hipertensiva\\_portal.htm](http://www.hepcentro.com.br/gastropatia_hipertensiva_portal.htm)>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2017.

HU, L.S.; GEORGE, J.; WANG, J.H. Current concepts on the role of nitric oxide in portal hypertension. *World J Gastroenterol*, v. 19, n. 11, p. 1707-17, 2013.

INFOESCOLA. Sistema Digestivo – Estômago. Disponível em: <[www.infoescola.com/sistema-digestivo/estomago/](http://www.infoescola.com/sistema-digestivo/estomago/)>. Acesso em: 05 de março de 2017.

IWAKIRI, Y. Endothelial dysfunction in the regulation of portal hypertension. *Liver international*, v. 32, n. 2, p. 199-213, 2012.

IWAKIRI, Y.; KIM, M.Y. Nitric oxide in liver diseases. *Trends in Pharmacological sciences*, v. 36, n. 8, p. 524-36, 2015.

JARRY, A.; BACH-NGOHOU, K.; MASSON, D.; et al. Human colonic myocytes are involved in postischemic inflammation through ADAM17-dependent TNF $\alpha$  production. *British journal of pharmacology*, v. 147, n. 1, p. 64-72, 2006.

JEE, H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *Journal of Exercise Rehabilitation*, v. 12, n. 4, p. 255, 2016.

JEON, S.R.; KIM, J.O. Capsule Endoscopy for Portal Hypertensive Enteropathy. *Gastroenterology research and practice*, v. 2016, 2016.

KAVIANI, A.; OHTA, M.; ITANI, R.; et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates inducible nitric oxide synthase gene expression in the portal hypertensive gastric mucosa of the rat. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, v. 1, n. 4, p. 371-6, 1997.

KOZAREK, R.A.; BOTOMAN, V.A.; BREFDFELDT, J.E.; et al. Portal colopathy: prospective study of colonoscopy in patients with portal hypertension. *Gastroenterology*, v. 101, n. 5, p. 1192-7, 1991.

KUO, P.C.; SCHROEDER, R.A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Annals of Surgery*, v.221, n.3, p. 220-235, 1995.

KURUTAS, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, v. 15, n. 1, p. 71, 2015.

LEE, H.; REHMAN, A.U.; FIEL, M.I. Idiopathic Noncirrhotic Portal Hypertension: An Appraisal. *Journal of pathology and translational medicine*, v. 50, n. 1, p. 17-25, 2016.

LEE, S.S.; GIROD, C.; BRAILLON, A.; et al. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 251, n. 2, p. 176-80, 1986.

LI, S.; TAN, H.Y.; WANG, N.; et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 11, p. 26087-124, 2015.

LIAUDET, L.; SORIANO, F.G.; SZABÓ, C. Biology of nitric oxide signaling. *Critical care medicine*, v. 28, n. 4, p. 37-52, 2000.

LICKS, F.; HARTMANN, R.M.; MARQUES, C.; et al. N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats. *World journal of gastroenterology*, v. 21, n. 43, p. 12351, 2015.

LICKS, F.; HARTMANN, R.M.; SCHEMITT, E.; et al. Inflammatory bowel and oxidative stress changes in an experimental model of portal hypertension: action of N-acetylcysteine. *Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)*, v. 36, n. 4, p. 231-9, 2016.

LICKS, F.; MARQUES, C.; ZETLER, C.; et al. Antioxidant effect of N-acetylcysteine on prehepatic portal hypertensive gastropathy in rats. *Annals of Hepatology*, v. 13, n. 3, p. 370-7, 2014.

LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*, v. 71, n. 3, p. 241-9, 1985.

LOPEZ-TALAVERA, J.C.; MERRILL, W.W.; GROSZMANN, R.J. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology*, v. 108, n. 3, p. 761-7, 1995.

MA, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 53, p. 401-26, 2013.

MARCOLIN, E.; FORGIARINI, L.F.; RODRIGUES, G.; et al. Quercetin Decreases Liver Damage in Mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 112, n. 6, p. 385-91, 2013.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 1993.

MARQUES, C.; LICKS, F.; ZATTONI, I.; et al. Antioxidant properties of glutamine and its role in VEGF-Akt pathways in portal hypertension gastropathy. *World J Gastroenterol*, v. 19, n. 28, p. 4464-74, 2013.

MARTELL, M.; COLL, M.; EZKURDIA, N.; et al. Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. *World J Hepatol*, v. 2, n. 6, p. 208-220, 2010.

MARTINELLI, A.L.C. Hipertensão portal. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, v. 37, n. 3-4, p. 253-61, 2004.

MATTOS, A.A.; DANTAS-CORRÊA, E.B. *Tratado de Hepatologia*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.

MAYERI, L.E.; DE BONA, K.S.; ABDALLA, F.H.; et al. Perspectivas laboratoriais na avaliação da resposta inflamatória. *Revista Bras de Farmacologia*, v. 91, n. 4, p. 149-61, 2010.

MCCORMACK, T.T.; SIMS, J.; EYRE-BROOK, I.; et al. Gastric lesions in portal hypertension: inflammatory gastritis or congestive gastropathy? *Gut*, v. 26, n. 11, p. 1226-32, 1985.

MEHTA, G.; GUSTOT, T.; MOOKERJEE, R.P.; et al. Inflammation and portal hypertension – The undiscovered country. *Journal of hepatology*, v. 61, n. 1, p. 155-63, 2014.

MEKAROONKAMOL, P.; COHEN, R.; CHAWLA, S. Portal hypertensive enteropathy. *World journal of hepatology*, v. 7, n. 2, p. 127, 2015.

MENEGHINI, R.A. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*, v. 5, n. 28, p. 57-62, 1987.

MIÑANO, C.; GARCIA-TSAO, G. Clinical pharmacology of portal hypertension. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 39, n. 3, p. 681-95, 2010.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, v. 247, n. 10, p. 3170-5, 1972.

MOREIRA, A.J.; FRAGA, C.; ALONSO, M.; et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochemical pharmacology*, v. 68, n. 10, p. 1939-1946, 2004.

MOREIRA, A.J.; RODRIGUES, G.; BONA, S.; et al. Oxidative stress and cell damage in a model of precancerous lesions and advanced hepatocellular carcinoma in rats. *Toxicology Reports*, v. 2, p. 333-40, 2015.

MOURA, F.A.; DE ANDRADE, K.Q.; DOS SANTOS, J.C.; et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? *Redox biology*, v. 6, p. 617-39, 2015.

NAGAREDDY, P.R.; XIA, Z.; MACLEOD, K.M.; et al. N-acetylcysteine Prevents Nitrosative Stress-Associated Depression of Blood Pressure and Heart Rate in Streptozotocin Diabetic Rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*, v. 47, n. 4, p. 513-20, 2006.

NETTER, F.H. Atlas de Anatomia Humana. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

OHTA, M.; YAMAGUCHI, S.; GOTOH, N.; et al. Pathogenesis of portal hypertensive gastropathy: a clinical and experimental review. *Surgery*, v. 131, n. 1, p. 165-70, 2002.

ONUIGBO, M.A.C.; AGBASI, N.; ACHEBE, J.; et al. Pleuritic chest pain from portal hypertensive gastropathy in ESRD patient with autosomal dominant polycystic kidney disease misdiagnosed as pericarditis. *Journal of renal injury prevention*, v. 5, n. 1, p. 48, 2016.

OSTAFF, M.J., STANGE, E.F., WEHNKAMP, J. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO molecular medicine*, v.5, n.10, p. 1465-1483.

PENNISI, R.; ASCENZI, P.; DI MAIS, A. Hsp90: A New Player in DNA Repair? *Biomolecules*, v. 5, n. 4, p. 2589-2618, 2015.

PERRY, J.J.P.; SHIN, D.S.; GETZOFF, E.D.; et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1804, n. 2, p. 245-62, 2010.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D.B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

PICADA, J.N.; FLORES, D.G.; ZETTLER, C.G.; et al. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Molecular brain research*, v. 114, n. 1, p. 80-5, 2003.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; FICHNA, J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 387, n. 7, p. 605-20, 2014.

RAJEKAR, H.; VASISHRA, R.K.; CHAWLA, Y.K.; et al. Noncirrhotic Portal Hypertension. *Journal of clinical and experimental hepatology*, v. 1, n. 2, p. 94-108, 2011.

RIBEIRO, S.M.R.; DE QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; et al. A formação e os efeitos das espécies reativas no meio biológico. *Bioscience journal*, v. 21, n. 3, 2005.

RIPOLL, C.; GARCIA-TSAO, G. Management of Gastropathy and Gastric Vascular Ectasia in Portal Hypertension. *Clinics in liver disease*, v. 14, n. 2, p. 281-295, 2010.

SAUERBRUCH, T.; TREBICKA, J. Future therapy of portal hypertension in liver cirrhosis – a guess. *F1000prime reports*, v. 6, 2014.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, v. 46, n. 5, p. 705-716, 1986.

SHAH, V.; WIEST, R.; GARCIA-CARDENA, G.; et al. Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 277, n. 2, p. 463-8, 1999.

SHAHRIPOUR, R.B., HARRIGAN, M.R., ALEXANDROV, A.V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and behavior*, v.4, n. 2, p. 108-122, 2014.

SHARMA, B.; RAINA, S. Caput medusae. *The Indian journal of medical research*, v. 141, n. 4, p. 494, 2015.

SIKULER, E.; KRAVETZ, D.; GROSZMANN, R.J. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 248, n. 6, p. 618-25, 1985.

SOARES, J.P.; SILVA, A.M.; OLIVEIRA, M.M.; et al. Effects of combined physical exercise training on DNA damage and repair capacity: role of oxidative stress changes. *Age*, v. 37, n. 3, p. 61, 2015.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (Single-Cell Gel Test) a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems*, p. 203-12, 1999.

SPINA, G.P.; ARCIDIACONO, R.; BOSCH, J.; et al. Gastric endoscopic features in portal hypertension: final Report of a Consensus Conference, Milan, Italy, September 19, 1992. *Journal of hepatology*, v. 21, n. 3, p. 461-467, 1994.

SUZUKI, H.; NISHIZAWA, T.; TSUGAWA, H.; et al Roles of oxidative stress in stomach disorders. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, v. 50, n. 1, p. 35-9, 2012.

TENG, R.J.; WU, T.J.; AFOLAYAN, A.J.; KONDURI, G.G. Nitrotyrosine impairs mitochondrial function in fetal lamb pulmonary artery endothelial cells. *Cell physiology*, v. 310, n.1, p. 80-88, 2016.



TUÑÓN, M.J.; SAN-MIGUEL, B.; CRESPO, I.; et al. Melatonin treatment reduces endoplasmatic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *Journal of pineal research*, v. 55, n. 3, p. 221-8, 2013.

URRUNAGA, N.H.; ROCKEY, D.C. Portal Hypertensive Gastropathy and Colopathy. *Clinics in liver disease*, v. 18, n. 2, p. 389-406, 2014.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. *Rev bras alergía imunopatol*, v. 24, p. 146-54, 2001.

VERCELINO, R.; TIEPPO, J.; DIAS, A.S.; et al. N-Acetylcysteine Effects on Genotoxic and Oxidative Stress Parameters in Cirrhotic Rats with Hepatopulmonary Syndrome. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 102, n. 4, p. 370-6, 2008.

VIEIRA, E.K.; BONA, S.; DI NASO, F.C.; et al. Quercetin Treatment Ameliorates Systemic Oxidative Stress in Cirrhotic Rats. *ISRN gastroenterology*, v. 2011, 2011.

VOROBIOFF, J.; BREDFELDT, J.E.; GROSZMANN, R.J. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 244, n. 1, p. 52-7, 1983.

WERAWATGANON, D.; RAKANANURAK, N.; SALLAPANT, S.; et al. Aloe vera attenuated gastric injury on indomethacin-induced gastropathy in rats. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 48, p. 18330, 2014.

YANG, Y.Y.; LEE, K.C.; HUANG, Y.T.; et al. Effects of N-acetylcysteine administration in hepatic microcirculation of rats with biliary cirrhosis. *Journal of hepatology*, v. 49, n. 1, p. 25-33, 2008.

ZABOT, G.P.; CARVALHAL, G.F.; MARRONI, N.P.; et al. Glutamine prevents oxidative stress in a model of mesenteric ischemia and reperfusion. *World J Gastroenterol*, v. 20, n. 32, p. 11406-14, 2014.

ZHUANG, R.X.; WANG, F.G.; ZHOU, H.P.; et al. The protective effect of N-acetylcysteine magnesium against liver cirrhosis with portal hypertension in rat. *Chinese journal of experimental and clinical virology*, v. 26, n. 5, p. 366-9, 2012.

ZIMENT, I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomedecine & pharmacotherapie*, v. 42, n. 8, p. 513-9, 1988.

ZOROV, D.B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S.J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological reviews*, v. 94, n. 3, p. 909-50, 2014.

ZUO, D.; SUBJECK, J.; WANG, X.Y. Unfolding the Role of Large Heat Shock Proteins: New Insights and Therapeutic Implications. *Frontiers in immunology*, v. 7, p. 75, 2016.